



**Asociación Argentina de
Veterinarios de Laboratorios
de Diagnóstico.**

Informe sobre Leptospirosis

**Comisión Científica de
Leptospirosis.**

2017

Comisión Científica de Leptospirosis.

Brihuega Bibiana: Coordinadora CCPL. Instituto de Patobiología. Referencia OIE. CICVyA- INTA Castelar

Draghi María Graciela: Excoordinadora del Programa Nacional de Sanidad Animal- INTA.

Farace María Isabel: Laboratorio de Bacteriología, Instituto Carlos Malbrán

Francois Silvina: Facultad de Veterinaria, Universidad Nacional de Rosario

Koval Ariel: Laboratorio Biogénesis Bagó

Petrakovsky Jessica: Laboratorio de Leptospirosis , Referencia OIE- SENASA

Tealdo Marta: Instituto de Zoonosis Luis Pasteur

INTRODUCCIÓN

La Leptospirosis es una enfermedad infecto-contagiosa, aguda y febril causada por una bacteria del género *Leptospira* que afecta sobre todo a los animales salvajes y domésticos, que sirven como fuente de infección para el hombre. Presenta una epidemiología compleja y distribución cosmopolita, en la que varias especies, principalmente los roedores actúan como huéspedes de mantenimiento de muchas serovariedades en todo el mundo, siendo el hombre y los animales de explotación huéspedes accidentales.

La República Argentina es un país endémico con brotes epidémicos. En la ganadería su importancia radica en las pérdidas por fallo reproductivo donde pueden aparecer natimortos, abortos y/o nacimientos de animales débiles e infertilidad. Resulta difícil estimar las pérdidas por este concepto, en gran parte por las dificultades inherentes al diagnóstico de la enfermedad (Ellis, 1994).

La presencia de la leptospirosis como enfermedad independiente, apenas supera los 100 años. La misma permaneció oculta durante mucho tiempo dentro de un grupo de enfermedades que presentaban similares manifestaciones clínicas, y que recién pudieron comenzar a diferenciarse a principios del presente siglo (siglo XX). El médico alemán A. Weil, fue el primero que basándose en aspectos clínicos, patológicos y epidemiológicos, logró diferenciar la leptospirosis de otras enfermedades de características similares.

El primer aislamiento *in vitro* del agente etiológico se realizó en 1914, por un grupo de investigadores japoneses (Inada, Ido, Hoki y Kanedo) quienes lograron reproducir la enfermedad inoculando sangre de un paciente enfermo en cobayos. Los primeros aislamientos en los animales domésticos, se lograron entre la década del 30 y el 40. En 1933 en los perros; 1940 en los cerdos; en 1935 se relacionó la ictero-hemoglobinuria de los terneros como manifestación clínica de leptospirosis, lo que quedó confirmado en 1940 con el aislamiento del agente causal. En los equinos en 1934 en Japón se realiza la primera observación directa del microorganismo, en riñón.

En nuestro país, el estudio de la enfermedad en los animales, se inicia en 1926, cuando el Dr. Mazza, en la provincia de Salta observa el microorganismo en frotis de órganos de perro; y el primer aislamiento lo realiza Edmee Chiodi en ratas de la ciudad de Buenos Aires, en 1934. Desde esos estudios hasta el día de hoy se han realizado numerosas investigaciones en todas las especies animales, en el hombre y en el medio ambiente.

LEPTOSPIRAS: NOMENCLATURA, TAXONOMIA

La leptospirosis es producida por bacterias que se agrupan dentro del Orden *Spirochaetale*, Familia *Leptospiraceae*, Género *Leptospira*. Dentro de este género hay actualmente dos clasificaciones taxonómicas de las especies de leptospiaras basadas en sus diferencias o características fenotípicas o genómicas.

Especies del género *Leptospira*

A) Clasificación fenotípica:

Leptospira interrogans (patógena) *sensu lato*

Leptospira biflexa (no patógena)

B) Clasificación genotípica:

17 genomoespecies diferentes

Según la clasificación serológica o fenotípica hay más de 225 serovares. La prueba de aglutinación microscópica y el test de absorción y aglutinación cruzada son usados para la clasificación de leptospiaras a nivel de serovariedad (Johnson et al., 1984; Kmety et al., 1993). Los serovares serológicamente relacionados son agrupados funcionalmente en serogrupos y el taxón básico es el serovar.

Las especies del género *Leptospira* han sido reclasificadas tomando como base los estudios de ADN. Es por esto que la clasificación fenotípica de leptospiaras está siendo reemplazada por la genotípica, en la cual un número de genomoespecies incluyen todas las serovariedades de ambas, *L. interrogans* y *L. biflexa*, habiéndose demostrado heterogeneidad genética (Kmety, E., 1993).

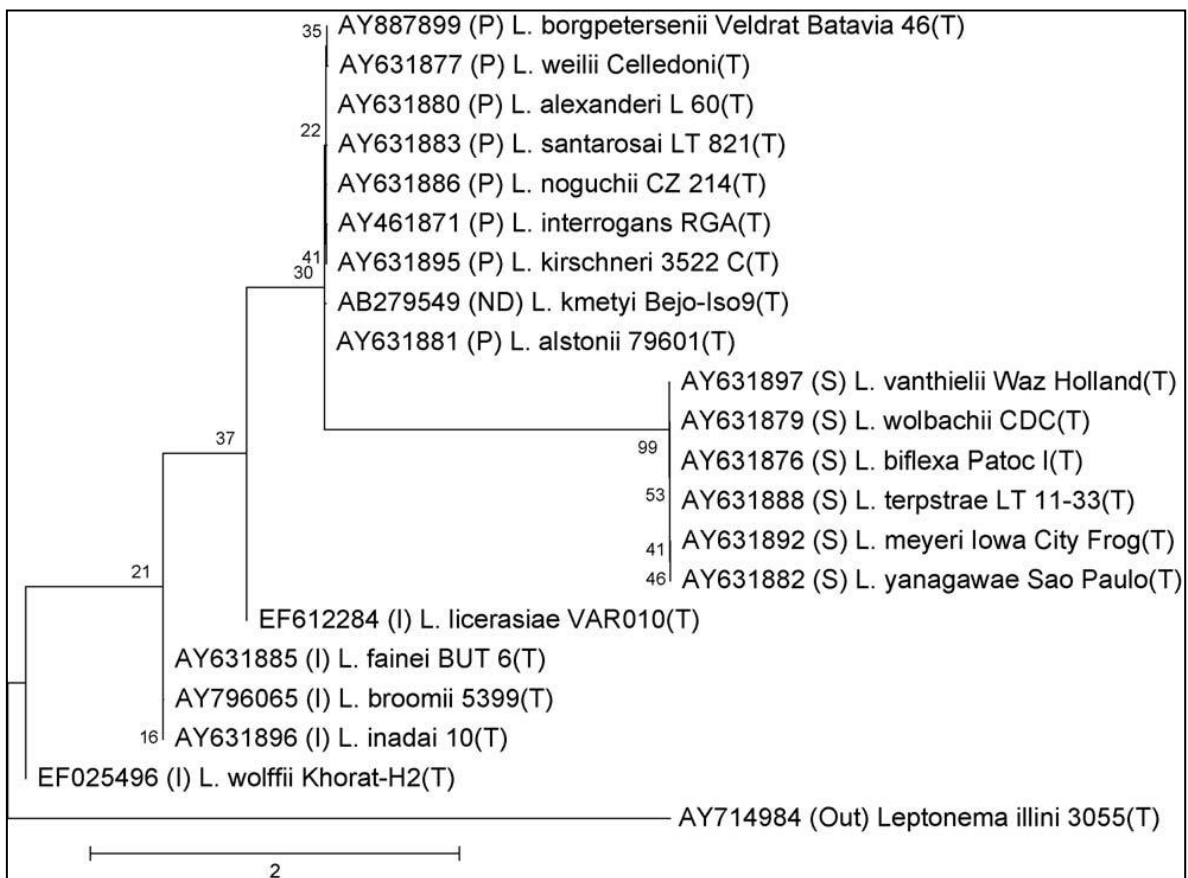
Las especies de leptospiaras aisladas de animales y humanos fueron diferenciadas en base a estudios del ADN llamándolas *L. interrogans*, *L. kirshneri*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. meyeri*, *L. inadai*, *L. fainei* y *L. alexanderi* (Yasuda et al., 1987).

El Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos de Norteamérica (CDC) ha definido 16 genomoespecies de leptospiaras incluyendo aquellas descritas previamente (Yasuda et al., 1987) y agregó cinco nuevas genomoespecies (Brenner et al., 1999), una de las cuales fue llamada *L. alexanderi*. Fueron también descritas otras especies como *L. fainei* que contiene una nueva serovariedad: *hurstbridge* (Perolat et al., 1998).

Las genomoespecies de *Leptospira* no corresponden a las dos especies previas (*L. interrogans* y *L. biflexa*) (Stanchi et al., 1996).

La serovariedad Hardjo, perteneciente al serogrupo Sejroe fue analizada con endonucleasas de restricción y se apreciaron diferencias entre distintos aislamientos, sugiriéndose su diferenciación en dos genotipos: Hardjoprajitmo y Hardjobovis (De la Peña-Moctezuma et al., 1999). Las cepas aisladas de humanos, ovinos y ciervos en Nueva Zelanda y de bovinos en Norteamérica presentaron patrones de ADN similares entre sí pero se diferencian de la cepa tipo original (Hardjoprajitmo). Estas cepas han sido designadas como genotipo Hardjobovis. La clasificación genética refleja estas diferencias ya que el genotipo Hardjobovis se adscribe a la genomoespecie *L. borgpetersenii*, mientras que el genotipo Hardjoprajitmo se adscribe a la genomoespecie *L. interrogans*.

En el año 2009 Cerqueira & Picardeau, tipificaron por el gen 16S diversas especies de *Leptospira* spp., formando tres clados (P=Patógenas; S= Saprófitas e I= Intermedias). A continuación se muestra el árbol filogenético establecido para estos clados.



Se continúa utilizando la clasificación serológica en los diagnósticos de rutina de laboratorio para evitar confusiones (MAT).

El Subcomité de taxonomía de Leptospiraceae de la International Leptospirosis Society, aprobó las siguientes modificaciones en la nomenclatura. Página de la International Leptospirosis Society, ILS. <http://www.leptosociety.org/about>

Género y especies: deben escribirse en cursiva

Serovar: no va en cursiva y en mayúscula.

Ejemplo: *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae

Leptospira interrogans serovar Hardjo

EPIDEMIOLOGIA

El punto de partida para la diseminación de la leptospirosis es la presencia de un portador, que pueden ser animales domésticos o silvestres, los cuales eliminan leptospiras con la orina en forma discontinua y por períodos de tiempo variables. De esta manera se efectiviza la infección directa a otros animales, de la misma u otras especies, como así también al hombre. La contaminación de aguas, barro o bebederos se transforman en la vía más importante de contagio. El agua es el vehículo para la leptospira.

La transmisión de la infección puede ser vertical (transplacental) u horizontal (directa o indirecta). La entrada de leptospiras al organismo se produce mediante heridas o abrasiones de la piel o mucosas superficiales, como la conjuntiva, nasofaringe y genital.

El signo característico de la enfermedad en los animales de producción es el fallo reproductivo, el aborto se produce por las lesiones endoteliales sistémicas, que también se presentan en los placentomas e impiden la transferencia de nutrientes y metabolitos entre la madre y el feto.

En los equinos se observa iridociclitis la cual se debe a una reacción de hipersensibilidad de tipo II, debido a una relación antigénica que presentan estructuras internas de los diferentes serovares de leptospiras con la superficie de la córnea y el cristalino. La puerta de salida más importante es la orina, flujos uterinos y abortos.

GENERALIDADES DEL DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de las enfermedades infecciosas es una de las herramientas indispensables para la lucha y el control de las mismas. La leptospirosis no escapa a esta generalización. Sin embargo, presenta algunas características particulares que dependen de su agente etiológico y de la relación que éste establece con su hospedador (animal infectado).

El diagnóstico de la enfermedad exige conocer perfectamente la dinámica de la infección, las técnicas de diagnóstico a utilizar, sus limitaciones y su valor relativo en las distintas etapas de la misma.

La patogenia de la infección: es fácil deducir cuales pueden ser las herramientas adecuadas para el diagnóstico en cada momento. La detección de anticuerpos en sangre será positiva a partir del décimo día aproximadamente, y si se toman 2 muestras con un intervalo de 15-20 días será posible observar una seroconversión con aumento del título de anticuerpos en 4 o más diluciones (Ej: 1/200 a 1/3200 o más). Este hecho es característico de la fase aguda. Posteriormente, la concentración de anticuerpos en sangre comienza a declinar lentamente a un ritmo variable, y pueden no observarse variaciones del título entre muestras obtenidas con 2 meses de diferencia; de ahí que la serología en la etapa crónica tenga poco valor diagnóstico (indica que hubo contacto con el agente, pudiendo esto deberse a una vacunación, infección persistente, etc.).

En cuanto al aislamiento del germen, durante la fase bacteriémica se lo puede aislar de sangre (hemocultivo), LCR, leche y prácticamente de cualquier órgano de la economía. A partir de la aparición de respuesta inmunológica se la debe buscar en riñón y por consiguiente en orina (se elimina intermitentemente por un período variable), y en aparato genital femenino y fetos (abortados o no).

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO:

La finalidad de los test serológicos es detectar los anticuerpos (sanguíneos, en LCR, orina, humor acuoso, leche) aparecidos como consecuencia de la infección por leptospiras.

Los tests se dividen en:

A) Tests screening (o género específicos): aglutinación macroscópica, fijación de complemento, hemoaglutinación, contraelectroforesis, inmunofluorescencia indirecta, ELISA, etc.

B) Tests específicos (o serovar específicos): microaglutinación (MAT), ELISA.

TEST DE MICROAGLUTINACIÓN (MAT):

Técnica serovar específica para el diagnóstico de la leptospirosis

✚ **Selección de antígenos:** en Argentina, se recomienda el empleo de los siguientes antígenos:

- **Bovinos, ovinos, caprinos, porcinos y equinos: Serovares:** Pomona, Pomona; Copenhageni, M 20; Tarassovi, Perepelicin; Wolffi, 3705 Castellonis, Castellon 3; Canicola, Hond Utrecht IV; Grippytyphosa, Moskva V

- **Caninos: Serovares:** Pomona, Pomona; Copenhageni, M 20; Castellonis, Castellon 3; Canicola, Hond Utrecht IV; Pyrogenes, Salinem

✚ **Muestras a utilizar:** El suero sanguíneo es la muestra de elección. El suero debe ser límpido, no presentar hemólisis ni contaminación. Siempre se solicitarán muestras pareadas, que en lo posible se procesarán juntas.

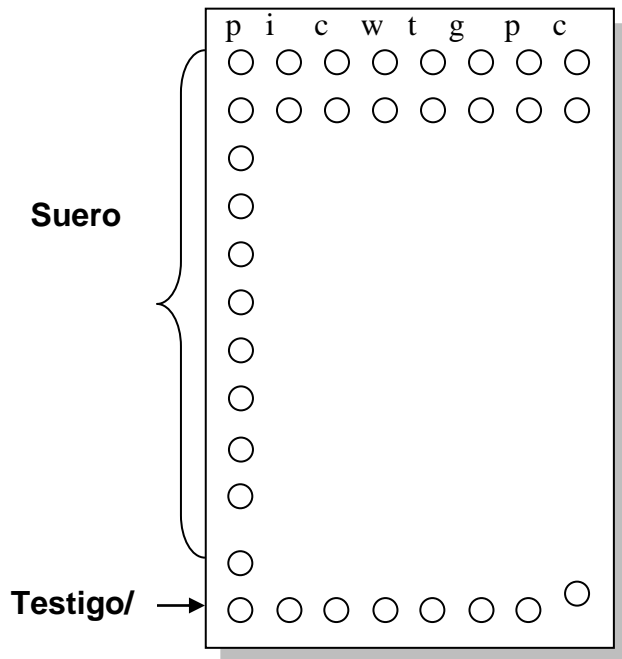
✚ **Diluciones del suero y otras muestras:** Están establecidas diluciones de partida (Puntos de corte) según las muestras o la especie animal en estudio.

✚ **Suero sanguíneo:** Humanos: 1/50; Bovinos: 1/200; Caninos y otras especies: 1/100; Animales silvestres: 1/50

✚ **Procedimiento:** Inicialmente se realiza el **screening o selección inicial** de los sueros positivos al punto de corte de la prueba según la especie animal.

Preparación de la policubeta

Serovares (antígenos)



Técnica:

1) Colocar en un tubo de hemólisis 2,45 ml de solución fisiológica o P.B.S. estériles, por cada suero.

2) Agregar 50 μ l de suero (con micropipeta o pipeta gotero). Dilución obtenida 1/50.

3) Homogeneizar.

4) Colocar 50 μ l de la dilución 1/50 de cada suero en cada orificio, por cada uno de los serovares en estudio (**sentido horizontal**).

5) Descarga del antígeno: calcular el volumen a usar; separarlo en tubo adicional; agregar 50 μ l de cada uno con micropipeta (dilución final en orificio 1/100) (**sentido vertical**).

6) **Testigo: uno por cada serovar de *L. interrogans* empleado.**

- 50 μ l de sol. Fisiológica o P.B.S.
- 50 μ l de antígeno
- Antes de incubar la reacción a la temperatura elegida, la misma será suavemente agitada a fin de homogeneizar.

7) **Incubación:**

El tiempo de incubación varía según la temperatura seleccionada:

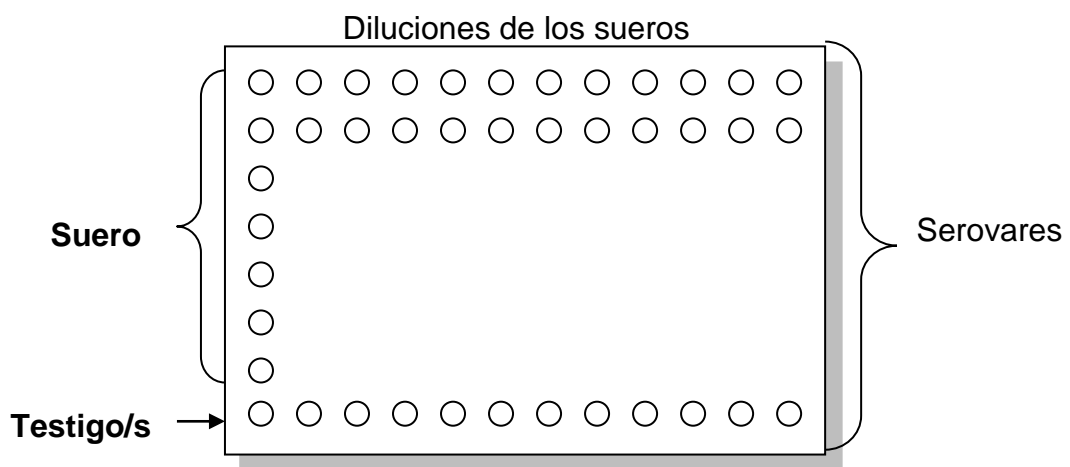
- a) 1 hora a 37°C; b) 2 horas a 28 °C; c) 1 noche a 4-8 °C

8) Lectura en microscopio de campo oscuro con aumentos de 100X o más.

Se considera reactivo un suero que aglutina el 50% o más de las leptospiras en comparación con un testigo. Para la lectura microscópica, el operador solo se ayudará con el empleo de un ansa de platino que deberá ser siempre la misma a fin de tener lecturas comparables. Cada gota colocada sobre el portaobjetos será inmediatamente leída. El ansa se apoyará sobre la superficie de la lámina de vidrio pero sin imprimirle movimiento rotatorio alguno.

TITULACIÓN

Preparación de la policubeta



✓

✓

✓ Técnica:

1) Dilución 1/50 de cada uno de los sueros positivos.

2) a- En el primer orificio colocar con micropipeta: 100 µl de la dilución del suero

b- En los orificios restantes colocar 50 µl de sol. Fisiológica o P.B.S.

3) Diluciones sucesivas del suero utilizando microdilutores de 50 µl.

Las diluciones siguientes para la titulación se harán en progresión geométrica de

2.

4) Descarga del antígeno:

- Calcular el volumen a usar.
- Separarlo en tubo adicional.
- Agregar 50 µl de cada uno con micropipeta.

5) Testigo:

- 50 µl de sol. Fisiológica o P.B.S.

- 50 µl de antígeno

6) Agitación e incubación

7) Lectura en campo oscuro: el título final del suero será la dilución del mismo que presente aglutinación del 50% de leptospiras libres en comparación con un testigo.

ELISA

Presenta mucha sensibilidad pero carece de la especificidad del MAT. Existen aquellos Elisas que detectan IgM e IgG, tanto en caninos como en grandes animales. También se han desarrollado para detectar anticuerpos antileptospira en humanos. La forma de preparación del antígeno varía: puede ser a partir de leptospiras muertas por calor, leptospiras sonicadas o a partir del LPS de la membrana externa.

DIAGNOSTICO BACTERIOLÓGICO

AISLAMIENTO

El aislamiento del agente etiológico es la prueba confirmatoria de un diagnóstico presuntivo de leptospirosis y su factibilidad es, en gran manera, dependiente del serovar que se intenta aislar. Requiere por parte del laboratorista conocimientos, elementos técnicos, minuciosidad y perseverancia. Es de destacar que cualquier muestra debe ser procesada lo antes posible.

INMUNOFLUORESCENCIA:

La inmunofluorescencia tiene como ventaja sobre el aislamiento que es una técnica rápida y de sencilla realización, pero se necesita de un microscopio de fluorescencia (luz ultravioleta) y de un observador avezado para no confundir el diagnóstico. La técnica consiste en tener anticuerpos marcados con fluoresceína. En la prueba **directa** estos anticuerpos marcados pueden estar dirigidos contra uno o varios epitopes de una cepa (monovalentes) o de varias cepas (polivalentes). Se deposita sobre un portaobjetos una gota del material a analizar (impronta de un órgano o una gota de orina previamente centrifugada y resuspendida en 0,1 ml de agua estéril). Se deja secar a temperatura ambiente y se fija con acetona (10'') también a temperatura ambiente. Se coloca el conjugado y se lo deja reaccionar durante una hora en cámara húmeda de 37°C. Luego se lava rápidamente con PBS (pH 7,2) y se lo tiñe con el colorante de contraste durante 30''. Se vuelve a lavar con PBS y se lo deja secar a temperatura

ambiente. Se monta con glicerina y un cubreobjeto y se lleva a mirar al microscopio de fluorescencia. La positividad de la muestra va a estar dada por la observación de elementos espiralados intensamente reaccionantes.

OTRAS TECNICAS DIAGNOSTICAS:

Observación al microscopio de campo oscuro (MCO). Es una técnica sencilla, pero muy difícil de lograr resultados positivos. Se debe centrifugar el material (orina, sangre, LCR) durante 20' a 10.000 rpm, y observar al microscopio, el sedimento que queda luego de descartar el sobrenadante.

La tinción argéntica es una técnica engorrosa, que requiere un observador experimentado. Las más conocidas son las de Levaditi y Warthin-Starry.

La tinción de inmunoperoxidasa no está muy difundida en los laboratorios de diagnóstico, reservándose su uso para los trabajos de investigación. El conjugado es más caro que el de inmunofluorescencia y su realización, más compleja; pero presenta la ventaja de que permite apreciar las bacterias en un microscopio óptico, al mismo tiempo que se observa el tejido.

HERRAMIENTAS MOLECULARES

Técnica de PCR consiste en la amplificación específica de secuencias de ADN por la acción de una ADN polimerasa. La especificidad de esta reacción está garantizada por el “primer” usado como sustrato y las condiciones de reacción. Presenta alta sensibilidad y especificidad. Está restringida a laboratorios de mediana a alta complejidad.

Ribotyping: Este método consta en determinar los perfiles de longitud de los fragmentos de restricción de DNA digerido probados con rRNA. *Leptospira* spp. tiene dos sets de 16S y 23S y uno o dos para el gen 5S rRNA pero no están relacionados cercanamente y se encuentran dispersos a lo largo del cromosoma. Dado el bajo número de genes rRNA este método de tipificación no cuenta con un poder muy discriminatorio entre especies.

Inserción de secuencias (IS): Este método basado en elementos de inserción de secuencias toman valor agregado en estudios epidemiológicos. Los elementos IS15000 y IS1502 fueron indentificados para *L. interrogans* y para *L. borgpetersenii* IS1533. El número de copias varía entre serovariedades y entre aislamientos de un determinado serovar. Este método puede discriminar serovariedades de diferentes especies de

Leptospira y entre serovares de una especie de *Leptospira* determinada. La secuenciación de los genomas de *L. interrogans* y *L. borgpetersenii* y la saprófita *L. biflexa* permitió la identificación de varios elementos IS de un amplio rango de familias IS.

Análisis de endonucleasas de restricción y electroforesis de campo pulsado en gel (PFGE): Métodos no basados en análisis de secuencias, incluyen la comparación de perfiles de restricción en geles de agarosa o de acrilamida. El análisis de endonucleasas de restricción de DNA genómico completo ha demostrado ser un método confiable para tipificar algunas cepas de *Leptospira*. Sin embargo, esta técnica es muy laboriosa y requiere de grandes cantidades de cultivo. La gran cantidad de bandas presentes dificulta la interpretación y la comparación entre laboratorios. Los patrones de PFGE obtenidos para determinado serovar son únicos de ese serovar. Sin embargo, se han reportado discrepancias entre métodos serológicos y PFGE, por ejemplo el PFGE no aparenta poder discriminar entre sí el serovar Copenhageni e Icterohaemorrhagiae de *L. interrogans*. A pesar de esto casi el 90% de los serovares pueden ser identificados en base a sus únicos patrones de PFGE.

Amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD) y PCR con primers arbitrarios (AP-PCR): Estos métodos de fingerprinting de cepas de *Leptospira* da resultados consistentes con el análisis de secuencias de 16S rRNA y análisis de similitud de secuencias DNA-DNA. Este método discrimina entre especies de *Leptospira* y representa una técnica simple y rápida para su identificación como también para comparar entre serovares. Estos métodos son una herramienta útil para estudios moleculares de epidemiología. Sin embargo, no son rentables para estudios de gran escala y su reproducibilidad es baja, lo cual dificulta la comparación de resultados entre laboratorios.

Análisis de polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP): Este método también es llamado análisis de polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados fluorescentes (FAFLP). Estos análisis implican un procedimiento de tres pasos en los cuales el DNA genómico esta restringido, ligado con adaptadores y después amplificado en fragmentos para la generación de footprints de las cepas. Este método utiliza el análisis computarizado del gel, lo cual facilita su análisis por clusters. Una desventaja de esta técnica, es que requiere de mucha más cantidad de cultivo (templado) que otros métodos de PCR.

Tipificación de secuencias en múltiples locus (MLST): Este método está basado en secuencias parciales de diversos genes housekeeping. Dos sets de genes han sido implementados *adk*, *icdA*, *lipL32*, *lipL41*, *rrs* y *secY* y el otro set está constituido por: *pntA*, *sucA*, *pfkB*, *tpiA*, *mreA*, *glmU* y *fadD*. El MLST puede ser usado para identificar clusters de aislamientos cercanamente relacionados en brotes y epidemias. Este método no requiere de grandes cantidades de DNA purificado pero requiere de un cultivo previo de un aislamiento. Es altamente reproducible entre laboratorios.

Análisis de repeticiones en tandem en múltiples locus (MLVA): Este análisis utiliza los locus VNTR (repeticiones en tandem de número variable) para tipificar las serovariedades presentes en las diferentes especies de *Leptospira*. Un análisis de la base de datos de repeticiones en tandem mostró que el genoma de *L. interrogans* presenta muchas secuencias repetitivas de menos de 100bp de longitud. Estas repeticiones son altamente útiles para analizar los polimorfismos basados en la electroforesis de los productos de PCR obtenidos. El MLVA es utilizado sólo para especies patógenas de *Leptospira* y puede discriminar entre serovares. Estudios posteriores deberán evaluar la estabilidad de estos microsatélites a lo largo del tiempo y distribución geográfica. Esta técnica es considerada altamente reproducible entre laboratorios y es una técnica que puede ser empleada en laboratorios clínicos como centros de investigación en países en desarrollo. La desventaja de esta técnica es que requiere de un aislamiento previo de la *Leptospira*, no puede ser utilizado directamente sobre muestras biológicas.

Leptospirosis en bovinos

Se ha descrito en todo el mundo y frecuentemente se da como resultado de la infección por los serovares Hardjo (genotipos Hardjobovis o Hardjoprajitno), Pomona o Grippotyphosa. También se han reportado casos de infecciones por los serovares Icterohaemorrhagiae, Bratislava, Hebdomadis, Kremastos, Tarassovi, Autumnalis, Australis, Sejroe, Bataviae, Saxkoebing y otros.

En muchas regiones el ganado está infectado con *L. borgpetersenii*, serovar Harjo, tipo Hardjobovis, del cual es huésped de mantenimiento, pero también se infecta con otros serovares incidentales específicos de cada región.

Los síntomas pueden ser una infección inaparente hasta una enfermedad aguda, febril y mortal dependiendo de varios factores como edad, estado inmunitario, serovar infectante, dosis infectante y virulencia de la cepa.

Las infecciones por serovares incidentales suelen ser agudas y más graves clínicamente que las infecciones por serovares adaptados como Harjo tipo Harjobovis.

La infección particular por el serovar Pomona en ganado joven puede resultar muy severa, con fiebre, anemia hemolítica, hemoglobinuria, ictericia, congestión pulmonar y muerte. En animales preñados la infección por serovares incidentales suele ocasionar abortos en forma de tormenta.

En otras partes del mundo, la forma más común de leptospirosis aguda se describe en vacas lecheras, con fiebre transitoria y una brusca caída en la producción de leche que dura de 2 a 10 días (“Milk drop síndrome”). En este cuadro la leche se describe de color amarillento, con consistencia similar al calostro, presencia de grumos y elevado recuento de células somáticas.

Se diferencia de cuadros de mastitis comunes porque toda la ubre se encuentra flácida. Este cuadro resulta más común con la infección por el serovar Hardjo tipo Hardjoprajitno, pero también por Harjobovis y otros serovares.

Se puede presentar como una infección epizoótica en un rodeo sin exposición previa, afectando a más de la mitad del rodeo durante un período de uno o dos meses, o por lo general se presenta como una infección endémica que afecta a algunos animales en su primera lactancia (Dhaliwal, Murray, Dobson, Montgomery y Ellis, 1996).

La forma crónica de leptospirosis bovina, producida comúnmente por el serovar Hardjo, generalmente se asocia con la infección fetal en animales preñados, produciendo abortos, mortinatos o nacimiento de animales prematuros y débiles (Ellis, 1994).

Los animales con infección congénita suelen presentar lesiones degenerativas en hígado y riñón y son propensos a morir por infecciones secundarias. Los que sobreviven quedan como portadores.

En el caso de infecciones crónicas por este serovar, el aborto puede producirse semanas o meses después de la infección inicial. Esta falta de asociación temporal entre infección y manifestación clínica dificulta el diagnóstico, ya que los títulos de anticuerpos pueden estar bajos o cayendo al momento del aborto.

Los animales afectados suelen presentar lesiones en los riñones, se observan macroscópicamente manchas blancas y cicatrices subcapsulares en la superficie de los mismos.

En rodeos infectados por el serovar Hardjo, se describe infertilidad caracterizada por muerte embrionaria temprana, aumento de los índices de servicios por concepción e

intervalo entre partos, que responde al tratamiento antibiótico. Se postula que se debe a la colonización uterina y de oviductos por este serovar (Dhaliwal, Murray, Dobson, Montgomery y Ellis, 1996).

El patrón de infección por Hardjo en un rodeo varía en relación al tipo y condiciones de explotación y al tipo de Hardjo presente. Además de Hardjoprajitno y Harjjobovis se han identificado diferencias genéticas, de localización tisular y de respuesta inmune entre aislamientos de diferentes orígenes. Harjoprajitno parece ser más virulenta que Harjjobovis, pese a que esta última se asocia con problemas de infertilidad y falla reproductiva en varias partes del mundo (Prescott, Miller, Nicholson, Martin y Lesnick, 1988).

Sin embargo, existen países como Australia y Nueva Zelanda donde la infección pese a ser endémica en sus rodeos no se considera como causa de pérdidas reproductivas relevantes, pero sí un problema de salud pública (Chappel, Millar, Adler, Hill, Jeffers, Jones, McCaughan, Mead y Skilbeck, 1989).

El diagnóstico de leptospirosis bovina es complicado porque los signos clínicos no son patognomónicos. El conocimiento epidemiológico de una región y los antecedentes del rodeo afectado pueden contribuir a incrementar el nivel de sospecha.

El cultivo de orina, riñón o material proveniente de fetos abortados es definitivo para demostrar la participación del agente, pero retrospectivo, ya que los resultados tardan semanas o meses. Además, requieren de un laboratorio equipado y personal experto.

La serología es el método más utilizado para el diagnóstico de leptospirosis bovina. En muchos casos, el incremento de 4 diluciones en el título de anticuerpos analizando muestras pareadas es indicativo de infección reciente. En el caso de contar con una sola muestra, las posibilidades de confirmar el diagnóstico se ven disminuidas.

Además, un alto porcentaje de animales infectados con el serovar Hardjo resultan seronegativos.

Leptospirosis bovina en Argentina

En nuestro país el cuadro agudo con altas tasas de abortos en el último tercio de la gestación y muerte de animales jóvenes está bien caracterizado desde hace muchos años, y el serovar responsable es inequívocamente Pomona.

En muy pocas ocasiones se ha aislado Canicola y en un caso de mortalidad en terneros Icterohaemorrhagiae.

No existe experiencia en el país con serovares adaptados al bovino, pese a existir muchísima serología positiva a los serovares Wolffi y Hardjo del serogrupo Sejroe, no se dispone de aislamientos de casos clínicos.

Solamente existen reportes de aislamiento de riñones obtenidos en matadero del serovar Hardjo en la década del 70 (Myers y col.) y más recientemente del serovar Caribe (Koval y López, 2009), en un rodeo con presencia de altos títulos de anticuerpos a Hardjo, que pertenece al mismo serogrupo. Actualmente se trabaja en el estudio de Hardjo a campo para conocer su rol.

Leptospirosis en Terneros de Recría

La leptospirosis es la causa infecciosa de aborto o muerte perinatal más importante en el nordeste argentino. Hasta el año 2008 la presentación más frecuente de leptospirosis en la zona fue la llamada "tormenta de abortos" en el último tercio de gestación o la muerte de terneros de menos de 14 días de vida. Por primera vez se observó un brote de leptospirosis ocurrido en un lote de terneros en recría, una presentación no informada hasta el presente en la provincia de Corrientes, Argentina. En el mes de abril de 2009, en un período de intensa sequía en la región, se registró la muerte de 100 terneros en el transcurso de una semana en un campo ubicado en el departamento de Mercedes, provincia de Corrientes. Los signos observados en los animales fueron: emisión de orina con sangre, decaimiento, anorexia y muerte en pocas horas. Estos terneros formaban parte de un lote de 1400 animales raza Bradford que pastoreaban un potrero de campo natural y eran suplementados con trigo, maíz y girasol. Los animales no habían sido vacunados para la prevención de la leptospirosis puesto que no existían en ese establecimiento antecedentes de la enfermedad. Se remitieron para el diagnóstico tres terneros muertos y dos agónicos. La determinación del serovar de los aislamientos de *Leptospira* spp. se realizó mediante la técnica de microaglutinación cruzada empleando los 23 antiseros de referencia del Royal Tropical Institute, Holanda. Los aislamientos también se caracterizaron genéticamente empleando la técnica conocida como MLVA (*Multiple-locus variable-number-tandem repeat analysis*), usando los cebadores VNTR4, VNTR7, VNTR9, VNTR10, VNTR19, VNTR23 y VNTR31

Las cepas fueron caracterizadas como *L. interrogans* serovar Pomona *sensu stricto* por ambos métodos (microaglutinación cruzada y MLVA).

Surge de este informe que la muerte de terneros de recría se debió a un brote de leptospirosis, una enfermedad poco frecuente en animales de esta edad. Como conclusión se recomienda considerar la presencia de esta enfermedad no solamente cuando se presentan abortos y muertes en terneros de pocos días, y vacunar como forma de prevención para evitar grandes pérdidas económicas en los establecimientos ganaderos.

Toma de muestras

En la mayoría de los casos, el profesional se encuentra con un problema clínico de muerte de animales o abortos, donde *Leptospira* puede ser responsable, o estar involucrados otros agentes infecciosos o no infecciosos. Por lo tanto la toma de muestras debe necesariamente contemplar los diagnósticos diferenciales.

Dentro de la complejidad que implica confirmar un diagnóstico de leptospirosis, siempre resulta más fácil en casos de mortalidad que de abortos.

El profesional puede revisar el lote afectado y observará animales apartados con aspecto febril, que no comen. Puede tomar temperatura a varios animales y observar sus mucosas (anemia y/o ictericia), esperar que orinen y observar hemoglobinuria.

Sobre un animal recientemente muerto puede hacer una necropsia, o seleccionar un animal enfermo, sacrificarlo y obtener muestras.

En la mayoría de los casos confirmados de leptospirosis los profesionales han observado hemoglobinuria.

Ante estos cuadros, se sospecha de leptospirosis o hemoglobinuria bacilar. Por lo general la hemoglobinuria bacilar se presenta en animales adultos, vacas preñadas y presenta una lesión característica en hígado que se reconoce con relativa facilidad en zonas donde la enfermedad se presenta regularmente. Es raro que una vaca adulta se muera de leptospirosis.

El otro diagnóstico diferencial que muchas veces no se tiene en cuenta en zonas no endémicas es la tristeza bovina, que también puede presentarse con hemoglobinuria.

Muestras

Obtener suero de varios animales del lote afectado para la prueba de microaglutinación (MAT) puede contribuir a orientar el diagnóstico. Si un gran número de animales resulta positivo a Pomona con títulos de 1:400 a 1:1600 probablemente se

trate de un brote de leptospirosis. Se necesita confirmar con una segunda muestra a los 10 a 12 días para ver si hay seroconversión.

Pero las muestras ideales para confirmar el diagnóstico serán obtenidas de una necropsia de un animal recientemente muerto o sacrificado en estado agónico. Las muestras de elección son riñón envuelto en su cápsula y orina tomada con jeringa y aguja estériles por punción vesical, diluida inmediatamente en medio de transporte para leptospira.

Ambas muestras se deben remitir bien refrigeradas y llegar lo antes posible al laboratorio para su procesamiento. Un profesional con experiencia puede observar leptospiras al campo oscuro directamente en orina diluida y /o realizar una inmunofluorescencia directa sobre improntas de riñón o sedimento urinario.

Si se tiene suerte y la carga de leptospiras en algunas de las muestras es lo suficientemente alta para poderlas visualizar con estas técnicas, el diagnóstico estará resuelto en cuestión de horas.

La inoculación experimental en hámsteres con el mismo material es una herramienta valiosa. Si los animales inoculados manifiestan sintomatología entre los 5 a 9 días seguramente estemos en presencia de un caso de leptospirosis. Los animales muertos permiten también hacer observación directa en campo oscuro e inmunofluorescencia y confirmar el diagnóstico en aproximadamente 10 días.

Por último, la única forma de aislar y tipificar el microorganismo es mediante el cultivo y aislamiento. Esto requiere de un laboratorio equipado y personal experto. Se debe realizar directamente a partir del material obtenido durante la necropsia y también de sangre y riñón de hámster inoculado experimentalmente. Lamentablemente el tiempo que lleva es prolongado, entre 2 y 20 semanas aproximadamente.

Si sospechamos de leptospirosis en un caso de estas características, es decir, mortalidad de animales jóvenes con hemoglobinuria, se recomienda aplicar tratamiento antibiótico a todo el lote. Si es leptospira, la mortalidad desaparece inmediatamente.

Dependiendo del número de animales afectados y tipo de explotación se puede aplicar penicilina estreptomycinina inyectable. Si los animales están comiendo ración, se puede tratar con penicilina estreptomycinina inyectable a aquellos animales que presentan signología (no comen) y dar tetraciclina en el alimento al resto de la tropa.

Abortos

Toma de muestras

Cuando se presentan abortos en un rodeo y se encuentra algún feto se suele remitir al laboratorio. En los mejores laboratorios del mundo el diagnóstico de causas de abortos a partir de fetos no supera el 50 %. O sea que si mando un solo feto al laboratorio como única muestra, las probabilidades de obtener un diagnóstico confirmatorio son muy bajas.

Sospechamos leptospirosis cuando los abortos se presentan en forma de tormenta, es decir, muchas vacas abortando en un período muy corto de tiempo, y animales que están en el último tercio de la gestación.

Esta es la situación conocida en nuestro medio, y es una de las pocas en que una intervención precoz del veterinario aplicando tratamiento antibiótico y vacuna puede efectivamente disminuir las pérdidas.

Pero, como se mencionó, el diagnóstico confirmatorio en estos casos es más complejo. Si se encuentran fetos en buenas condiciones se deben remitir al laboratorio junto con sueros de vacas que abortaron y que no abortaron.

Los agentes a investigar son varios, bacterianos, virales, protozoarios y requieren de un laboratorio muy equipado y personal experto.

El riñón fetal puede mostrar leptospiras por inmunofluorescencia en algunos casos, pero no siempre es un material adecuado para cultivo. Muchas veces, el feto muere por acción de leptospira pero para el momento en que es expulsado, esas leptospiras han perdido viabilidad debido a la autólisis.

Por este motivo, para poder aislar y tipificar leptospiras la muestra más adecuada es la orina de las vacas que abortaron y compañeras de lote, obtenida aplicando diurético y diluida en medio de transporte.

Si bien el aislamiento requiere esfuerzo, es la única manera de obtener cepas virulentas para elaboración y control de vacunas, así como también seleccionar los serovares que deben utilizarse para vacunar en una determinada región.

RESULTADOS

AISLAMIENTOS EN ARGENTINA

Aislamientos de leptospiras en bovinos- Período 2004-2014

Cepa	Serovar	Serogrupo	Especie	Tipo de explotación	Año	Material	Autores
*San Luis	N/D	Pomona	Bovino	Tambo	2004	Orina	Ariel Koval-Sebastián López
*AKRFB	Pomona	Pomona	Bovino	Cría	2004	Riñón fetal	Ariel Koval-Sebastián López
*El Jabalí	N/D	Pomona	Bovino	Tambo	2006	Orina	Ariel Koval-Sebastián López
*Tambo	N/D	Pomona	Bovino	Tambo	2006	Orina	Ariel Koval-Sebastián López
*Saint Martin	N/D	Pomona	Bovino	Tambo	2007	Orina	Ariel Koval-Sebastián López
*Mejía	N/D	Pomona	Bovino	Feed lot	2008	Orina y riñón	Ariel Koval-Sebastián López
*Lagioia	N/D	Pomona	Bovino	Feed lot	2008	Orina y riñón	Ariel Koval-Sebastián López
*Laphitzondo	Caribe	Sejroe	Bovino	Cria	2009	Orina	Ariel Koval-Sebastián López
**Mercedes	Pomona	Pomona	Bovino	Recría	2011	Riñón	Graciela. Draghi Bibiana Brihuega
*Odriozola	N/D	Pomona	Bovino	Tambo	2012	Orina	Ariel Koval-Sebastián López

N/D No determinado

*Las identificadas a nivel de serovar se remitieron al Royal Tropical Institute de Holanda.

** Las identificadas a nivel de serovar se genotificaron en el Laboratorio de Leptospirosis, Instituto de Patobiología, CICVyA-INTA Castelar.

Leptospirosis en Porcinos

Los signos clínicos son aborto; natimortos, momificación, debilidad en lechones. La leptospirosis en porcinos es alta, encontrando animales seroreactivos en un 30 % en la provincia de Buenos Aires. La misma tendencia se observa en todas las provincias de nuestro país (Petrakovsky et al., 2013). Los serovares involucrados son Pomona e Icterohaemorrhagiae.

Aislamientos de leptospiras en porcinos -Período 2005-2016

Cepa	Serovar	Serogrupo	Genotipo	Año	Material	Autor
Cañuelas Bi	Po	Po	Pomona Pomona	2005	Orina	Brihuega B
FACU	Ic	Ic	Icterohaemorrhagiae M20	2007	Riñón	Brihuega B

Po: pomona; Ic: icterohaemorrhagiae.

Caninos. Leptospirosis urbana

Está caracterizada como una de las infecciones animales y humanas más difundidas en el mundo. En humanos la infección se adquiere, además del contacto con mamíferos en forma directa, por riesgo ocupacional o recreativo. El contacto directo se da por las excreciones de animales que conviven con él principalmente en área urbana.

Importancia del contacto humano canino: En el medio urbano su principal mantenedor son los roedores, también son importantes los caninos, ya que la leptospirosis es una de las infecciones más frecuentes en esta especie. Generalmente se presenta de forma subclínica no diagnosticable y con leptospiruria por períodos prolongados constituyendo una fuente potencial de infección importante para el hombre, ya sea por contaminación del ambiente o por contacto directo con su orina.

Importancia del canino en la tríada epidemiológica: se jerarquiza como variable de riesgo para la infección canina la presencia de acúmulos de agua y los hábitos callejeros, como así también el sexo macho por sus hábitos.

Prevalencia en caninos del Área Metropolitana: dadas las características epidemiológicas cambiantes de la leptospirosis, es necesario conocer datos actualizados en su comportamiento como zoonosis urbana.

Serología positiva en caninos en la Ciudad de Buenos Aires (2000-2016): Ronda alrededor de un 15% de promedio desde el año 2000 al presente.

Características de brotes en animales de compañía en medios urbanos:

Brotos masivos: contagio indirecto, con distribución estacional, por riesgo ambiental.

Brotos circunscriptos: contagio directo o indirecto con distribución anual.

Inmunidad y Prevención en caninos: inespecífica: saneamiento ambiental; educación para la salud; bioseguridad. Específica: detección precoz de casos; quimioprofilaxis en expuestos

Vacunación en caninos: Bacterinas de célula completa.

Vacunas producidas por productos de subunidad celular.

Enfermedad en caninos

La leptospirosis tiene una presentación pleomórfica.

Fases de la enfermedad

- Penetración del agente
- Fase de leptospiremia
- Fase de vasculitis
- Fase renal
- Fase Hepática

Síntomas y lesiones

- Cuadro febril (leptospiremia)
- Sangre: acción endotóxica (CID)
- Mucosas inyectadas; petequias y equimosis; ictericia
- Riñón; nefritis intersticial aguda que evoluciona a cuadro crónico con FALLA RENAL.
- Hígado: necrosis hepática y daños de endotelios capilares
- Placenta: placentitis; abortos.

Cuadro signológico. Curso de la enfermedad

- Sobreagudo
- Agudo
- Subagudo.
- Asintomático

La mayoría de las presentaciones en caninos son subclínicas.

Leptospirosis: Normativa y tutorial para la vigilancia.

Ministerio de Salud de la Nación

- Caso sospechoso
 - Resultado no conclusivo
 - Leptospirosis probable
- Caso probable
- Caso comprobado
- Caso descartado

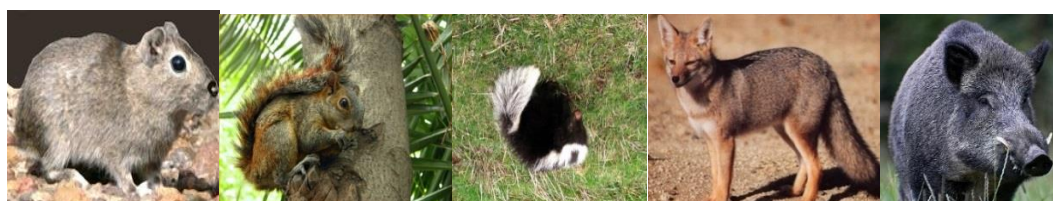
Debemos concientizar a los propietarios sobre la importancia del concepto de “Tenedor Responsable”.

Valorar el rol de los caninos como centinelas epidemiológicos para la enfermedad humana en áreas de riesgo.

Concientizar a los profesionales sobre la importancia de mantener un estudio epidemiológico permanente en las ciudades y el priorizar medidas de lucha ante presencia de roedores como diseminadores de las leptospiras.

Aislamientos de leptospiras en caninos- Período 2006-2016

Cepa	Serovar	Genotipo	Año	Material	Autores
Bel	Canicola	<i>L. interrogans</i> serovar Portlandvere MY 1039	2006 Bs As	Orina	Passaro D Sonsini A
SB	Pomona	<i>L. interrogans</i> serovar Pomona	2008 Bs As	Riñón fetal	Brihuega B Grune Loffler S
Sarmiento	Canicola	<i>L. interrogans</i> serovar Portlandvere MY 1039	2007 Bs As	Orina	Stiebel C
La Plata 4581	Canicola	<i>L. interrogans</i> serovar Portlandvere MY 1039	2012 La Plata	Sangre	Passaro D Sonsini A
La Plata 5478	Canicola	<i>L. interrogans</i> serovar Portlandvere MY 1039	2012 La Plata	Orina	Passaro D Sonsini A
Avellaneda	Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> serovar Icterohaemorrhagiae RGA	2007 Bs As	Orina	Brihuega B
Mayo	Canicola	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Canicola Hond Utrecht IV	2008 Bs As	Orina	Stiebel C
Dogy	Canicola	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Canicola Hond Utrecht IV	2009 Bs As	Orina	Cepario INTA Castelar



Importancia de los animales silvestres en la leptospirosis

Diferentes investigaciones han descrito la importancia de los animales silvestres como componentes vitales en el ciclo epidemiológico de enfermedades del hombre y de los animales domésticos. Se ha estimado que el 60 % de los patógenos emergentes que afectan al hombre son zoonóticos y que de éstos, más del 70 % tienen origen en la fauna silvestre. Las investigaciones relacionadas con la mortalidad y morbilidad de la vida silvestre, han sido reconocidas como un aspecto crucial para los proyectos de conservación de estas especies, especialmente, en los programas de reintroducción y translocación.

Los animales silvestres pueden ser portadores facultativos o propiamente dichos, ambos constituyen una fuente importante de difusores de esta zoonosis y son importantes reservorios de la leptospira, bacteria que se acantona en el riñón, en los túbulos contorneados proximales. Todos los animales silvestres son capaces de eliminar leptospiras a través de la orina, pero los roedores son los más importantes transmisores

de la enfermedad, dado que eliminan esta bacteria durante toda la vida. En Argentina se han aislado leptospiras en numerosos animales silvestres, comadrejas, peludos, zorros, zorrinos, guanacos, coypos, nutrias, cuises, liebres, ballena, jabalí, sapos, especies introducidas como la ardilla vientre rojo, y en numerosos roedores, *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* y *Mus musculus*.

Se han realizado numerosos estudios serológicos en distintas especies, ciervos colorados, ciervos de los pantanos, caimanes, boas, sapos, focas, lobos marinos, mara patagónica, camélidos sudamericanos, felinos salvajes, nutrias, carpinchos, chinchillas, jabalí, roedores, encontrando altos porcentajes de seropositivos.

Por lo que podemos decir que los animales silvestres tienen un rol muy importante en el mantenimiento y transmisión de la enfermedad.

Cuadro de Aislamientos en animales silvestres 2006-2016

Especie silvestre	Región	Aislado por
Zorro (<i>Lycalopex griseus</i>)	Provincia de Buenos Aires-2013	Scialfa E
Comadreja (<i>Didelphys albiventris</i>)	Provincia de Buenos Aires-2015	Scialfa E
Roedores (<i>Rattus norvegicus</i>, <i>Rattus rattus</i>)	Provincia de Buenos Aires y Santa Fe-2014	Grune Loffler S-Brihuega B
Ardilla vientre rojo (<i>Callosciurus erythraeus</i>)	Provincia de Buenos Aires-2013	Brihuega B
Ballena (<i>Eubalaena australis</i>)	Provincia de Chubut-2015	Grune Loffler S
Armadillo (<i>Chaetophractus villosus</i>)	Provincia de La Pampa-2014	Kin MS
Zorrino (<i>Conepatus Chinga</i>)	Provincia de Buenos Aires	Scialfa E
Comadreja (<i>Didelphys albiventris</i>)	Provincia de Buenos Aires-2007	Brihuega B
Jabali (<i>Sus scrofa</i>)	Provincia de Rio Negro-2013-2017	Brihuega B
Guanaco (<i>Lama guanicoe</i>)	Provincia de Neuquén-2014	Brihuega B
Roedores (<i>Rattus norvegicus</i>, <i>Rattus rattus</i>) and mice (<i>Mus musculus</i>)	Provincia de Buenos Aires-2014-2015	Brihuega B

La emergencia de las zoonosis en vida silvestre

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define a una enfermedad emergente como aquella que se ha reconocido recientemente o que ha ocurrido previamente, pero que muestra un incremento en la incidencia y, por tanto, ha aumentado su distribución geográfica, los hospederos y vectores susceptibles o su prevalencia en los últimos años. Aunque el incremento en la incidencia de las enfermedades emergentes, puede ser el resultado de la mejora de su conocimiento o el fortalecimiento de la vigilancia epidemiológica, las investigaciones sugieren que las epidemias en la fauna silvestre, son un problema de importancia creciente y de respuesta urgente. La aparición de las zoonosis de vida silvestre está asociada con una serie de factores causales, los cuales se describen en la mayor parte de ellos, como el resultado de actividades humanas, tales como el incremento de la densidad demográfica, los viajes y el comercio mundial de fauna silvestre, cambios en los patrones del uso del suelo, mayor contacto entre los seres humanos, la vida silvestre y los animales domésticos, y otros factores ambientales. Se han establecido además, determinantes microbiológicos como las mutaciones, la selección natural y la evolución. Los determinantes del hospedero (resistencia natural, inmunidad innata y adquirida); determinantes naturales (ambiente, clima, aumento de precipitaciones) y los determinantes accidentales.

Las epidemias emergentes en vida silvestre se pueden dividir en tres categorías: a) las producidas por microorganismos que recientemente han invadido poblaciones silvestres, las cuales debido a la alta susceptibilidad de los hospedadores se diseminan de forma explosiva en la población. Los patógenos involucrados frecuentemente están presentes en otras especies silvestres o en hospederos domésticos o salvajes; b) microorganismos nativos que han coexistido por largos períodos con hospederos específicos, que se diseminan a otras áreas geográficas en una población similar de hospederos susceptibles, como el resultado de nuevos factores externos, que pueden afectar las condiciones ambientales que generan estrés y facilitan la diseminación de agentes, en especial de agentes parasitarios; c) patógenos que recientemente han afectado hospederos inmunosuprimidos, que se encuentran en condiciones ambientales alteradas, especialmente, por actividades humanas. En este sentido, la leptospirosis es considerada una enfermedad emergente en la vida silvestre, pero su origen y los factores antropogénicos que participan en su presentación no son claros.

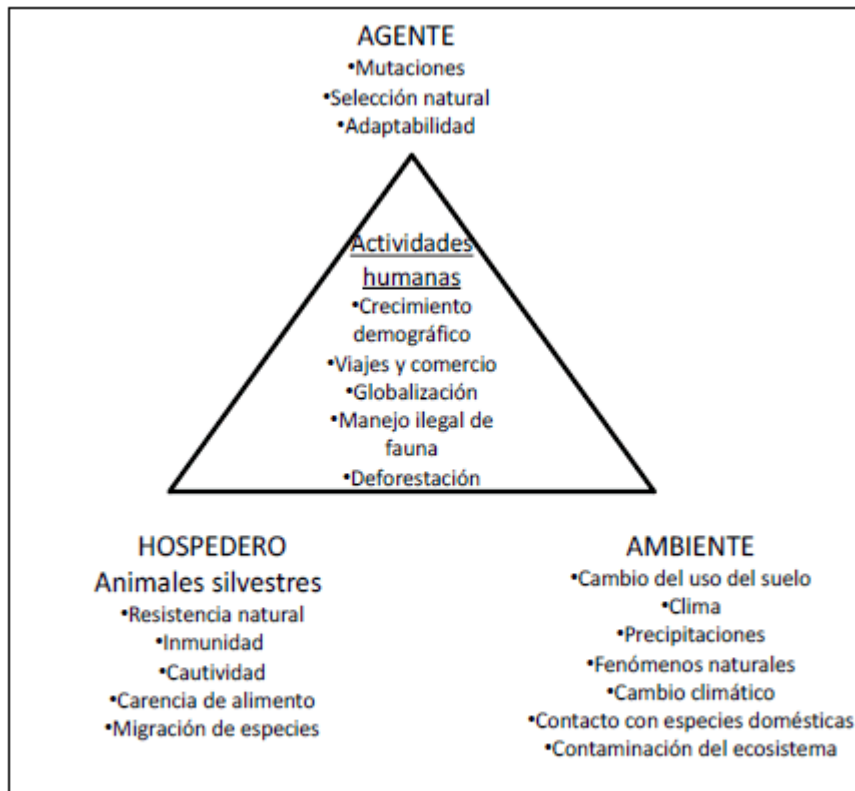


Figura 1. Factores determinantes de emergencia de las zoonosis en fauna silvestre.

Aislamientos del Medio ambiente

Reconquista II	<i>L. interrogans</i> <i>Icterohaemorrhagiae</i>	Río Buenos Aires	2004	Agua	Brihuega B
Cepa Rosario	<i>L. borgpeterssenii</i>	Río Rosario	2013	Agua	Francois S

Estudios serológicos en animales de producción y animales de compañía

Bovinos

La región pampeana y la región mesopotámica son las regiones que concentran la mayor serología en bovinos.

El serovar predominante en bovinos hasta el momento fue Pomona.

2013- 2015, se realizó el análisis serológico con la técnica MAT de una población bovina en zonas cercanas a la ciudad de Rosario, Provincia de Santa Fe, resultaron seropositivas al MAT el 35,41%. Se identificó, Pomona (46%); Wolffi (32%); Tarassovi (8%); Grippotyphosa (1%) y Canicola (1%). Se halló seropositividad a *Icterohaemorrhagiae* dentro del 12% de animales que reaccionaron a más de un

serovar (coaglutinaciones). Los títulos más altos fueron 1:1600 a 1:3200 y se registraron para el serovar Pomona.

2006-Resultaron seropositivas al MAT el 40 % de los bovinos analizados. La frecuencia con la que se identificó cada serovar fue la siguiente: Pomona (46%); Wolffi (32%); Tarassovi (8%); Grippytyphosa (1%) y Canicola (1%).

En distintas regiones de Argentina, los serovares predominantes son Pomona, Wolffi y Hardjo, resultando en promedio el 31% seropositivo, dependiendo la zona del país.

Equinos

Con respecto a los equinos, son seroreactivos en promedio el 49 %. Serovares reaccionantes: Pomona, Icterohaemorrhagiae, Grypotyphosa.

Los equinos pueden presentar cuadros de ictericia, aborto y fluxión periódica.

Porcinos

Los serovares reaccionantes son: Pomona e Icterohaemorrhagiae, ambas serovarietades que han sido aisladas en la provincia de Buenos Aires en establecimientos porcinos y en crianza traspatio. Las zonas estudiadas mediante la técnica serológica MAT, corresponden a región pampeana, sus resultados son:

En **2009**, en granjas testeadas el 59,70% fueron positivos a Pomona, 16,41% a Bratislava, 16,41% a Tarassovi, 2,98% a Castellonis y 1,49% tanto a Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes y Grippytyphosa.

2010-El 32% resultaron sueros reactivos frente a uno o más serovares de *L. interrogans*. De los sueros que reaccionaron a un único serovar 60.2% fueron positivos al serovar Pomona, 24.2% a Tarassovi, 9.2% a Icterohaemorrhagiae, 3.6% a Castellonis, 2.15% a Pyrogenes, 0.7% a Grippytyphosa

2012- Resultaron sueros reactivos frente a uno o más serovares de *L. interrogans*, hallándose una tasa de seropositividad del 35%. Dentro de los seroreactivos se hallaron 77% positivos a un único serovar. De los cuales 59,70% fueron positivos a Pomona, 16,41% a Bratislava, 16,41% a Tarassovi, 2,98% a Castellonis y 1,49% tanto a Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes y Grippytyphosa.

2015- Se halló una tasa de seropositividad del 33,93%. Se encontró 78,03% positivos a Pomona, 6,35% a Icterohaemorrhagiae, 6,35% a Pyrogenes, 1,15% a Canicola, 5,20% a Bratislava y 2,89% a Tarassovi.

RESULTADOS PRESENTADOS POR LA COMISIÓN EN LA AAVLD 2016

Se utilizaron para el estudio la técnica de microaglutinación , MAT, la técnica PCR en muestras utilizando los primers G1 y G2 y la técnica molecular Variable Number Tandem Repeats para obtener el perfil genético de los aislamientos. Datos de los últimos 3 años.

Resultados: En caninos se obtuvieron los siguientes resultados: sobre 235 sueros enfrentados con MAT el 17 % fueron seropositivos. Las serovariedades intervinientes fueron *Leptospira interrogans* serovar Canicola, *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. En animales de producción sobre 5840 sueros bovinos se encontró un 36 % de seropositivos. Las serovariedades intervinientes: *Leptospira interrogans* serovar Wolffi, *Leptospira interrogans* serovar Hardjo, *Leptospira interrogans* serovar Pomona. En pequeños rumiantes, 344 sueros dieron 15 % seropositivos a *Leptospira interrogans* serovar Pomona. En porcinos el 27 % fueron positivos, serovars reaccionantes Pomona e Icterohaemorrhagiae. Las PCR realizadas en muestreos caninos detectaron casos positivos con correlación serológica.

Los aislamientos logrados a partir de orina y riñón de bovinos de cría y de tambo fueron identificados como *Leptospira interrogans* serovar Pomona.

La identificación molecular realizada con la técnica molecular Variable Number Tandem Repeats para obtener el perfil genético de los aislamientos dio perfiles con 100 % de correlación frente a las cepas referenciales.

En humanos, 298 casos fueron seroreactivos, 278 sexo masculino y 20 sexo femenino. Las serovariedades intervinientes Ballum, Canicola, Pomona e Icterohaemorrhagiae. Fueron casos provenientes de las provincias de Buenos Aires, Salta, Corrientes, Córdoba y Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Es una enfermedad a tener en cuenta de presentación polimórfica, de difícil erradicación que se puede controlar a través de la información, las medidas higiénicas sanitarias y la vacunación.

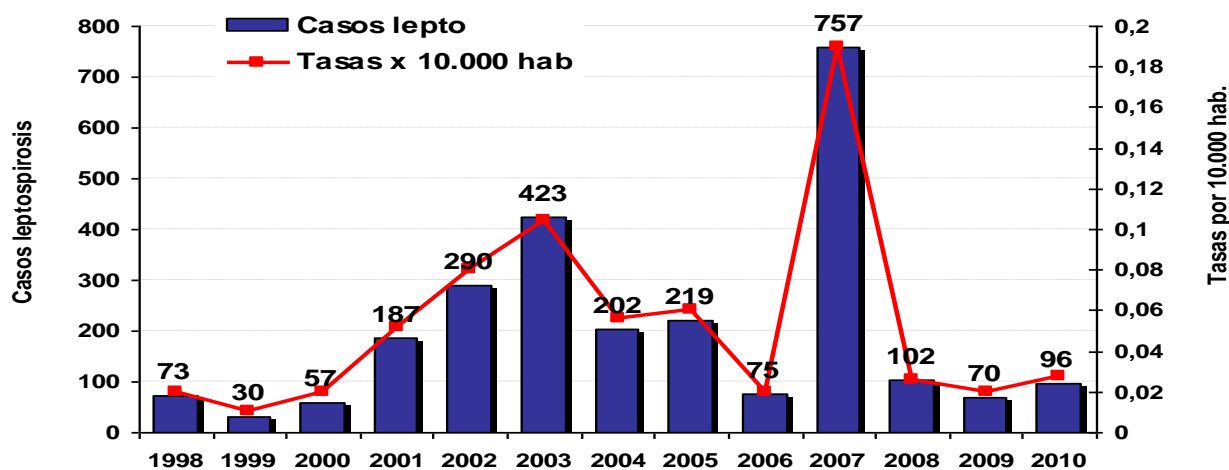
LEPTOSPIROSIS EN HUMANOS

SITUACIÓN EPIDEMIOLOGICA DE LEPTOSPIROSIS

Número de casos de leptospirosis. Argentina.

Período 1998-2010* N= 2597- Fuente: SNVS-SIVILA *A la Semana

Epidemiológica 11 de 2010



- Veterinarios
- Actividad agrícola y ganadera :
 - ✓ Trabajadores de huertas
 - ✓ Campos de arroz
 - ✓ Cosecha de caña
 - ✓ Cría de animales de producción
- Albañiles
- Limpieza de alcantarillas
- Trabajadores de frigoríficos

El Boletín Integrado de Vigilancia, N° 327 – SE 37 – 2016 en su página 100, muestra los Casos Acumulados de leptospirosis hasta la 32ª semana epidemiológica, años 2015 – 2016 y se reportan 2858 casos humanos, con 102 confirmados.

Diagnóstico clínico

Sospechar Leptospirosis: fiebre de inicio abrupto, inyección conjuntival, mialgia, ictericia y epidemiología compatible

INCUBACION: 7-15 Días

FASE FEBRIL de leptospiremia (1º Semana): fiebre, mialgias, artralgias, inyección conjuntival, ictericia, distrés respiratorio (neumonía atípica).

FASE ORGANICA (2º semana -leptospiruria- periodo inmunológico):
insuficiencia renal hasta anuria, meningitis, cuadro hepático.

Diagnóstico diferencial:

- Dengue.
- Hantavirus
- Otras fiebres hemorrágicas
- Clamidia- Micoplasma
- Meningitis viral.
- Afecciones hepáticas.

En todos los casos de enfermedades febriles de iniciación aguda y de origen desconocido debe considerarse la posibilidad de leptospirosis y realizar el diagnóstico de laboratorio.

CASO SOSPECHOSO: enfermo febril agudo, con cefalea, mialgia, en ausencia de síntomas en vías aéreas superiores, con epidemiología compatible, seguido o no de ictericia, meningitis, nefropatía, neumonía, hemorragias.

- **CASO CONFIRMADO:** es el caso confirmado por el laboratorio por:
 - a) conversión serológica en muestras pareadas con la prueba de aglutinación microscópica (MAT).
 - b) aislamiento de cepa de leptospira a partir del cultivo en medios especiales de sangre heparinizada.
 - c) detección por PCR convencional o PCR en tiempo real.

PREVENCION Y CONTROL DE LEPTOSPIROSIS

La leptospirosis es una zoonosis a controlar ya que es sumamente difícil de erradicar debido a que el microorganismo se puede albergar y expulsar en la orina de muchos animales, perpetuándose entre ellos el estado de portador.

La leptospirosis en los animales es omnipresente. Se ha encontrado en casi todas las regiones, con excepción de las regiones polares, y en prácticamente todas las especies animales.

El punto central en la epidemiología de la leptospirosis es el portador renal, que excreta leptospiras al medio ambiente. La transmisión sexual también es importante dentro de una especie. En teoría cualquier *Leptospira* puede infectar cualquier especie animal, pero sólo un pequeño número de serovares son endémicos en cualquier región o país en particular.

Además, cada serovar tiende a mantenerse en huéspedes de mantenimiento específicos. Por lo tanto, en cualquier región, una especie animal se infecta por serovares mantenidos por esa especie o por serovares mantenidos por otras especies de animales presentes en el área.

Los animales susceptibles adquieren la infección por contacto directo o indirecto con orina o tejido de animales infectados.

Especies tales como los ratones (*Mus musculus* y otras *Mus sp.*) y ratas (principalmente *Rattus norvegicus* y *R. rattus*) sirven como reservorios de serovares relacionados con esas especies huésped.

Usualmente los animales reservorios no muestran signos pero albergan leptospiras en sus riñones, siendo una importante fuente de infección para humanos y animales

La leptospirosis en el ganado, sobre todo en los rebaños lecheros afectados con Pomona y Grippytyphosa fue reconocida en la década de 1930 y surgió como un problema en todo el mundo, tanto para la cría de animales como para la salud humana en la década de 1950. Aproximadamente entre 1975-1985 la leptospirosis en granjas lecheras, causada por el serovar Hardjo fue reconocida en varias partes del mundo .

Transmisión

La transmisión por contacto directo puede producirse de diversas maneras, siendo una de las más importantes la entrada de leptospiras por vía inhalatoria, conjuntival o cutánea, procedentes de núcleos goticulares formados por la dispersión de

la orina de animales infectados. Esto es debido a que los hospedadores de mantenimiento de un determinado serovar eliminan gran cantidad de microorganismos en su orina durante un período de tiempo prolongado, por lo que las gotas de orina tendrán una alta concentración de gérmenes.

Los roedores se contagian entre sí por distintas vías y son a su vez fuente de infección para animales domésticos. Además a este esquema se agrega el agua ya sea por inundaciones, cursos naturales, aguas estancadas, etc.

Los factores que determinan su supervivencia en el medioambiente son: temperatura templada (25 °C), ambiente húmedo, pH neutro o ligeramente alcalino y presencia de materia orgánica. Por tanto, las áreas con lagunas, riachuelos y bebederos en general, que congregan a un gran número de animales, son las que más frecuentemente están implicadas en los focos de leptospirosis. Estos factores van a propiciar la existencia de una cierta estacionalidad en la presentación de la enfermedad, en relación principalmente con la época de lluvias.

En el ganado lechero es donde todas las condiciones para la transmisión de la leptospirosis están presentes (existencia de roedores, de raciones que atraen a estos y luego son consumidas por los bovinos, agua estancada, hacinamiento de animales dos veces al día durante el ordeño).

En el ganado de carne, aunque el manejo es diferente, y no existe el hacinamiento ni las raciones, la enfermedad se encuentra presente.

Los cerdos criados en régimen intensivo plantean un problema diferente a los criados a campo o semicautiverio. En grandes criaderos la posibilidad de infección cruzada es muy importante debido a la densidad de población. El movimiento de cerdos de un corral a otro y el contacto con desechos de otros corrales son los medios más importantes de diseminación en las granjas. La introducción de la enfermedad en una de ellas puede suceder por la incorporación de un padrillo que sea portador de leptospira en su aparato genital.

En Argentina, dadas las características de cría del ganado bovino en las que el contacto con los animales sólo se produce en forma esporádica cuando se recorren los potreros y dado que los signos clínicos de los adultos son poco evidentes sospechamos la presencia de leptospirosis cuando se producen abortos en forma de tormenta o hay muerte perinatal de los terneros.

En bovinos de tambo los animales están en contacto más estrecho con el personal, por lo que pueden evidenciarse algunos signos como: mastitis, ubre flácida, disminución de la producción láctea, leche sanguinolenta.

Medidas de control en medicina veterinaria

Podemos agrupar las medidas de control aplicables en medicina veterinaria en:

- ✚ Medidas higiénico-sanitarias
- ✚ Vigilancia epidemiológica
- ✚ Prevención.

1. Medidas Higiénico-Sanitarias

Deben basarse en dos puntos esenciales: el control de hospedadores de mantenimiento silvestres y el de hospedadores domésticos. Para lograrlo algunas opciones son:

Desratización general de la explotación.

Implementar programas de control de roedores e higiene ambiental en forma permanente.

Construcción de edificios «a prueba de roedores» Se debe controlar la población de roedores protegiendo los depósitos de raciones y alimentos.

Las buenas prácticas de higiene pueden disminuir la carga microbiana del ambiente teniendo especial cuidado que la orina de los animales infectados no permanezca en contacto con equipos, herramientas e instalaciones.

La presencia de roedores y de aguas estancadas son fuentes de leptospirosis a controlar.

Evitar el uso de fuentes de agua comunales.

Reducir el pastoreo conjunto con otras especies domésticas y con otros rodeos.

Mantener una política de ciclo cerrado y en su defecto, someter a cuarentena estricta a los animales de reposición que entran nuevos en la explotación.

No separar las crías de la hembra.

Numerosos trabajos han sido publicados indicando el uso de antibióticos para controlar fundamentalmente la eliminación de leptospira por orina al medio ambiente. Lamentablemente no existen suficientes evidencias que demuestren la eficacia de la antibioticoterapia para la eliminación de la leptospiruria.

La profilaxis higiénico-sanitaria es esencial en el control de la enfermedad en un rodeo, pero siempre ha de formar parte de un sistema general de control, junto con la vacunación y la epidemiología, ya que ninguna de estas medidas es eficaz por separado.

2. Vigilancia epidemiológica

Se deben realizar esfuerzos para conocer la prevalencia de serovares específicos en una determinada población y descubrir los focos de contagio a fin de evitar aparición de nuevos casos.

Para ello se recomienda:

- Estudiar todas las especies susceptibles y poblaciones a riesgo para determinar la prevalencia y presencia de serovares en cada especie.
- Realizar el aislamiento de cepas de leptospira spp. en distintas especies para conocer los serovares actuantes.
- Realizar estudios de reservorios silvestres.
- Realizar estudios epidemiológicos para estudiar la evolución de la enfermedad.
- Implantar un programa de extensión y comunicación para lograr la participación de la comunidad.

El conocimiento de la epidemiología de la enfermedad es la base de la prevención y control de la infección en el hombre y los animales.

El control de la enfermedad debe planificarse de acuerdo al tipo de tenencia del animal considerando siempre el riesgo para el hombre.

3. Prevención

El mejor método de prevención es una vacunación sistemática.

En bovinos el plan de vacunación sugerido por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) es el siguiente:

1° dosis al 4° mes de edad, 2° dosis a los 30 días de la primera, 3° al año de edad, y revacunación anual.

En el caso de un rodeo que nunca ha sido vacunado debe vacunarse toda la población inicial, revacunar anualmente e incorporar al plan de vacunación a los nacidos y a los animales de reposición.

Si existen hembras no vacunadas o no se conoce su plan sanitario anterior deben vacunarse con una primera dosis 45 días antes del servicio y una segunda dosis 30 días después de la primera (o sea 15 días antes del servicio).

Los caninos deben vacunarse entre las 10 a 12 semanas de vida aplicando una segunda dosis un mes después y revacunaciones anuales.

Las bacterinas pueden ser mono o polivalentes a distintos serovares de *Leptospira interrogans*, líquidas o liofilizadas, combinadas o no con agentes virales, pero los serovares empleados deberán ser siempre locales. Teóricamente cualquier mamífero es capaz de infectarse por cualquier serovar, pero en la práctica unos pocos serovares son enzoóticos en una región.

En nuestro país los serovares predominantes en animales son Pomona, Icterohaemorrhagiae y Canícola.

Todas las vacunas deberán ser aprobadas por el Servicio Oficial. La metodología de control de calidad de las bacterinas es la establecida en la Disposición N° 405/88 del Servicio Nacional de Sanidad Animal y Calidad Agroalimentaria (SENASA) en cuanto a esterilidad, inocuidad, inactivación, pH y potencia.

Prevención de leptospirosis humana

Las leptospiras son transmitidas de animal a animal y del animal al hombre. La forma más frecuente de transmisión al hombre consiste en la exposición a orina, sangre, tejidos u órganos de animales infectados o indirectamente, a través del contacto con agua, suelo húmedo o vegetación contaminados con orina de animales infectados, como ocurre al nadar o por inmersión accidental. Es una clara enfermedad ocupacional asociada a actividades que favorecen el contacto con los animales o sus productos: veterinarios, criadores de animales, empleados de mataderos, tamberos, trabajadores rurales de zonas de humedales (arroceras y caña de azúcar), granjeros, trabajadores de alcantarillados, hurgadores de residuos, entre otros. También se asocia con actividades deportivas, especialmente náuticas.

La puerta de entrada es la piel excoriada, la piel íntegra pero que ha permanecido inmersa en agua por tiempo prolongado y las mucosas íntegras: orofaríngea, nasal, ocular o genital.

La protección individual de los trabajadores se logra mediante el uso de calzado y vestimentas apropiadas (botas, delantal, guantes, tapaboca, etc.) según la tarea que desempeñen.

Este personal debe ser advertido sobre los riesgos que corre para lograr que estas medidas no sean vistas como imposiciones caprichosas y sean adaptadas a conciencia.

Medidas preventivas

- Higiene personal y del ambiente doméstico, se debe impedir el ingreso de animales al interior de los domicilios así como a los galpones de producción o almacenamiento de alimentos. Se debe hacer hincapié en la higiene y desinfección en los locales de ordeño así como de las máquinas o instrumentos utilizados y prestar especial atención a la remoción y destino de desechos.

- Drenaje o relleno de terrenos bajos o fácilmente anegadizos.
- Evitar nadar en cursos de agua que puedan estar contaminados o utilizar la misma para consumo o uso doméstico.
- Control de roedores tanto de las especies sinantrópicas como de las silvestres.

Básicamente debemos evitar el acceso de los roedores al alimento, agua y abrigo. Esto se logra acondicionando los edificios para impedir la entrada de roedores, destruyendo las madrigueras, colocando los alimentos y los desechos en recipiente herméticos, desmalezando el peridomicilio, aplicando medidas de eliminación como cebos y trampas en los lugares de riesgo, identificando y preservando los predadores naturales en el área.

La leptospirosis es una enfermedad a prevenir no a curar.

Referencias Bibliográficas

- Adler B. and A. de la Peña Moctezuma /.2010. *Veterinary Microbiology* 140 (2010) 287–296
- Brihuega Bibiana, Samartino Luis, Romero Graciela, Auteri Carmelo, Martinez Mara, Grune Sylvia. First isolation of *Leptospira borgpetersenii* from fetuses of wild boars (*Sus scrofa*). *Rev Electronic Journal of Biology*; 2017. Lugar: Delaware.
- Brihuega, B.; Pavan, M.; Cairo, F.; Auteri, C.; Funes, D.; Romero, G. y Samartino, L. 2007. *Leptospira* patógena en riñón de *Didelphys albiventris* (comadreja). *Rev Arg Microbiol*, 39:19.
- Disposición SENASA N°405/88
- Draghi G, Brihuega B., Benitez D., Sala J.M., Biotti G. M., Pereyra M., Homse, Guariniello L.. 2011 Brote de leptospirosis en terneros en recría en la provincia de Corrientes, Argentina. *Rev. Arg Microbiol.* 43: 42-44.
- Ellis William A. Animal Leptospirosis 2014 Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015 B. Adler (ed.), *Leptospira and Leptospirosis, Current Topics in Microbiology and Immunology*
- Faine S, B. Adler, C. Bolin, P. Perolat *Leptospira and Leptospirosis* Second Edition Melbourne, Australia. 1999. MediSci
- Faine, S. (1994): *Leptospira and Leptospirosis*; CRC Press, Boca Ratón; 353pp.
- Gozzi AN, M. Laura Guichón Verónica Victoria Benitez Graciela Noemi Romero, Carmelo Auteri& Bibiana Brihuega. 2013. First isolation of *Leptospira interrogans* from the arboreal squirrel *Callosciurus erythraeus* introduced in Argentina. *Wildlife Biology*, 19 (4):483-489.

-Francois S., Brihuega B., Grune S., Gattarello V., Correa D.; Petrakovski J., Gualtieri C. y Arestegui M. 2013. Aislamiento de *L. borgpetersenii* a partir de fuentes de agua en la ciudad de Casilda, Santa Fé, Argentina. *Rev Cub Med Trop.*; 65(2).

-Grune Loffler S, Rago V, Martínez M, Uhart M, Florin-Christensen M, Romero G, Brihuega B. Isolation of a seawater tolerant *Leptospira* spp from a Southern Right Whale (*Eubalaena australis*). *PLoS One.* 2015 Dec 29; 10 (12):e0144974. doi:10.1371/journal.pone.0144974. eCollection 2015.

-Grune Loffler S, Diego Passaro, Luis Samartino, Analía Soncini, Graciela Romero, Bibiana Brihuega. 2014. - Genotypes of *Leptospira* spp. strains isolated from dogs in Buenos Aires, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2014;46 (3):201-204

-Grune Loffler S, Pavan ME, Vanasco B, Samartino L, Suarez O, Auteri C, Romero G, Brihuega B. 2014. Genotypes of pathogenic *Leptospira* spp isolated from rodents in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Rio de Janeiro: 1-5, 2014

-Kin MS, Brihuega B, Fort M, Delgado F, Bedotti D, Casanave EB. 2015. Presence of antibodies against *Leptospira* serovars in *Chaetophractus villosus* (Mammalia, Dasypodidae), La Pampa province, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* Jan-Mar;47(1):41-6. doi: 10.1016/j.ram.2015.01.005. Epub 2015 Mar 6

-La Scola, B.; Bui, L.T.; Baranton, G.; Khamis, A.; Raoult, D. 2006. Partial *rpoB* gene sequencing for identification of *Leptospira* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 263: 142-147.

-Levett P. N. 2008. Minutes International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of *Leptospiraceae*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58 : 1049-1050.

-Levett, P.N.; Morey, R.E.; Galloway, R.; Steigerwalt, A.G.; Ellis, W.A. 2005. Reclassification of *Leptospira parva* Hovind-Hougen *et al.*, 1982, as *Turneriella parva* gen. nov. comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1497-1499.

-Majed,Z.; Belenger, E.; Postic, D.; Pourcel, C.; Baranton, G.; Picardeau, M. 2005. Identification of variable-number-tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans* sensu stricto. *J. Clin. Microbiol.* 43, 539-545. .

-Matthias, M.A.; Ricaldi, J.N.; Cespedes, M.; Diaz, M.M.; Galloway, R.L.; Saito, M.; Steigerwalt, A.G.;Patra, K.P.;Ore, C.V.;Gotuzzo, E.;Gilman, R.H.; Levett, P.N.;Vinetz, J.M. 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, e213.

-Micheloud JF, Martínez M, Zurita SG, Grune S, Romero G, Brihuega B .Aborto por *Leptospira* en una yegua en Salta, Argentina. *Revista FAVE – Sección Ciencias Veterinarias* 14 (2015) 37-40; doi: www.dx.doi.org/10.14409/favecv.v14i1/2.5507.Versión impresa ISSN 1666-938X-Versión digital ISSN 2362-5589

-Parma AE, Seijo AC, Luchesi PM, Deodato B, Sanz ME. Differentiation of Pathogenic and Non-Pathogenic *Leptospiras* by Means of the Polymerase Chain Reaction. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* 1997; 39 (4): 203-7.

-Pavan, M.E.; Cairo, F.; Pettinari, J.; Samartino,L.; Brihuega, B. 2011. Genotyping of *Leptospira interrogans* strains from Argentina by Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Analysis (MLVA). *Comp.Immunol.Microbiol. Infect. Dis.* 34: 135-141.

-Pavan, M.E.; Brihuega B.; Pettinari, M.J., Cairó, F. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of reference strains used for the diagnosis of leptospirosis in Argentina. *Revista Argentina de Microbiologia* 2011; 43:251-255.

-Pavan, M.E., Cairo , F., Brihuega, B., Samartino, L., 2008. Multiple-locus variablenumber tandem repeat analysis (MLVA) of *Leptospira interrogans* serovar Pomona from Argentina reveals four new genotypes. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 37–45.

-Scialfa E, Grune S, Aguirre P, Romero G, Brihuega B. 2015. Didelphis albiventris (Zarigueya overa) un portador de *L. Icterohaemorrhagiae* en la provincia de Buenos Aires, Arg. Revista Electrónica de Veterinaria. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> (ISSN 1695-7504) REDVET . Veterinaria.org

-Scialfa E, Brihuega B, Recavarren M y col. Circulación de leptospiras patógenas en áreas periurbanas y rurales del centro de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Raz y Eie* 2013; 8(13): 17-23.

-Scialfa E, Giampretti S, Brihuega B, Grune S, Aguirre P, Gallicchio O. 2013. Leptospirosis en animales sinantrópicos capturados en áreas periurbanas de la ciudad de Azul, Provincia de Buenos Aires. *Revista de Infectología* D. Francisco J. Muñiz, Buenos Aires, 2013; 16 (1): 32.

-Scialfa E, Brihuega B, Venzano A, Morris WE, Bolpe J, Schettino M. 2013 . First Isolation of *Leptospira interrogans* from *Lycalopex griseus* (South American Gray Fox) in Argentina Shows New MLVA Genotype. *J. Wildl Dis.* 49 (1): 168-72.

-Scialfa E , Bibiana Brihuega, Winston Eduardo Morris, Mariana Recavarren Silvina Quintana, Sylvia Grune, Graciela Romero, Jorge Bolpe, Mateo Schettino. 2012 First isolation of *Leptospira interrogans* from *Conepatus Chinga* in Argentina. *African Journal of Applied Microbiology Research* October, 1(1): 1-5

-Seijo A, Coto H, San Juan J y col. Distrés respiratorio debido a hemorragia pulmonar por leptospirosis. *Medicina (Buenos Aires)* 2002; 62:135-40

-Seijo A, Romer Y, San Juan J y col. Neumonía aguda de la comunidad y hemorragia pulmonar por leptospirosis en el Área Metropolitana Buenos Aires. *Medicina (Buenos Aires)* 2011; 71: 127-34.

-Slack, A.T.; Kalambaheti, T.; Symonds, M.L.; Dohnt, M-F.; Galloway, R.L.; Steigerwalt, A.G.; Bahaman, A.R.; Craig, S.; Harrower, B.J.; Smythe, L.D.; 2009. *Leptospira kmetyi* sp.nov. isolated from an environmental source in Malaysia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 705-708.

-Slack, A.T.; Symonds, M.L.; Dohnt, M.F.; Smythe, L.D.; 2006^a. Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC. Microbiol.* 6, 95.

-Stanchi, N.O y Brihuega, B.: Familia Leptospiraceae, 159-175. In Stanchi, N.O.; Martino, P.E.; Gentilini, E.; Reinoso, E.H. y Pennimpe, E. (ed.): Temas de microbiología veterinaria, Ed. Sur, La Plata; 1996.

-Técnica MAT. Instructivo IP-PT-Lep-01: Procedimiento Método de ensayo MAT.

Laboratorio de Leptospirosis. Instituto de Patobiología. INTA. Castelar. 2015

-Yasuda, P.H.; Steigerwalt, A.G.; Sulzer, K.R.; Kaufmann, A.F.; Rogers, F.C.; Brenner, D.J.; 1987. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. *Int.J. Syst. Bacteriol.* 37: 407-415.

-Ministerio de Salud Pública.. Dirección General de la Salud Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca: Dirección General de Servicios Ganaderos, Organización Panamericana de la Salud OPS/HCP/HCV/URU.ZOO.01/02, Organización Mundial de la Salud. OPS/HCP/HCV/URU.ZOO.01/02. Guía de Control y Manejo de Leptospirosis.1994