



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

Infección experimental en becerros con cepas virulentas de
Leptospira

T E S I S

Que para optar por el grado de Maestra en Ciencias

P R E S E N T A

Olga Marina Girón Camacho

T U T O R

Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma (FMVZ, UNAM)

C O M I T É T U T O R A L

Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser (FacMed, UNAM)

Dr. Francisco Javier Basurto Alcántara (FMVZ, UNAM)

Ciudad Universitaria, CD.MX. Agosto 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis con todo el cariño a mis padres Olga Camacho y Roberto Girón quienes me han apoyado siempre en cada etapa de mi vida, me han motivado a concluir este grado y son mi ejemplo para querer superarme en la vida profesional y personal; los amo padres, les estoy agradecida por todo.

A mi hermano Omar que siempre ha estado a mi lado como mi cómplice dándome el ejemplo de cómo vivir la vida con perseverancia y actitud.

A mi abuelita Tomy[†] y a mi tía Paty[†] que son la luz que siempre me guía y que me protege; las extraño y las admiro siempre.

A mi abuelito Justo Camacho, mi tío Javier, a mi abuelita Agustina, mi abuelito Roberto Girón y a mi tío Héctor por valorar mi esfuerzo y creer en mí.

A los amigos y doctores que he conocido, que me han acompañado y orientado a lo largo de la maestría, les agradezco infinitamente, su apoyo fue indispensable. Su amistad y sus enseñanzas son lo más bonito y valioso que me llevo; gracias a la Dra. Luz Olivia Castillo, Maggi Martínez, Ramiro Quintanar y su hijo Ramiro, Dra. Edith Maldonado, Maximiliano Ruiz, Noemí Quijano, Iván Ortega, Rocío Valdés, Irma Loyola, Eloy García, Gabriela Espino, Leonardo Tovar, Dra. Eugenia Candanosa, Dra. Yesmín Domínguez, Dr. Iván Carrisoza, Ing. José Luis Barranco, Dra. Carolina Segundo, Dra. Beatriz Arellano, Dr. Alejandro Benítez, Dr. Joel Mosqueda, y en particular al Dr. Alejandro de la Peña por haberme dado la oportunidad de crecer de manera personal y profesional en el laboratorio y en la realización de esta maestría, gracias por creer en mí y por la confianza.

A Brenda Estrella mi compañera en esta experiencia, con quien he aprendido y desaprendido, te dedico también esta tesis, agradezco el apoyo, tus cuidados, el cariño, la paciencia y la motivación que siempre me has brindado para salir adelante, has sido el motor de mis días cuando más lo he necesitado; también

quiero agradecer a toda tu familia que me ha apoyado y que me ha recibido con los brazos abiertos, muy particularmente a tu mamá Alma, a tu abuelita Paula, a tu tía Claudia†, y a Nicole, les agradezco su cariño y su apoyo de todo de corazón. A los animalitos que han formado parte de mi familia, en especial gracias a mis perritos: Perly, Pongo, Roñas, Kipper, Luna, Pulguis, Chilis y Nube. Por último, quiero agradecer a los animales que fueron parte de este estudio y en general para todos aquellos empleados en pro de la ciencia.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento obtenido por el Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Dirección General del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México, proyecto PAPIIT IT202320; a la Dra. Irma Eugenia Candanosa Aranda, y al Dr. Gerardo F. Quiroz Rocha, de la USEDICO, del CEIEPAA, de la FMVZ, de la UNAM por su asesoría en la interpretación de lesiones patológicas macro y microscópicas y en los análisis clínico patológicos respectivamente. Al director técnico del CEIEPAA Dr. Héctor Basurto Camberos y al ingeniero Agustín Gallegos Martínez por la donación de los animales para esta investigación, así como para su manejo, alimento e instalaciones. A mi comité tutorial y al jurado por sus consejos y aportaciones al trabajo, a la Dra. Ingeborg Dorothea Becker, Dr. Francisco Basurto, Dra. Beatriz Arellano, Dr. Carlos Carmona, Dr. Iván Carrisoza y a mi tutor el Dr. Alejandro de la Peña-Moctezuma.

RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa y contagiosa de mamíferos domésticos y silvestres. En los bovinos causa principalmente infertilidad y abortos, lo que representa pérdidas económicas importantes. Los animales infectados son fuente de contaminación ambiental y de infección a otros animales susceptibles y al humano. Se previene mediante medidas de higiene, así como la aplicación de inmunógenos específicos. Diversas vacunas experimentales, sobre todo de proteínas de membrana de *Leptospira*, han sido evaluadas en su papel para estimular inmunidad sólida en animales. La potencia de tales vacunas se evalúa en modelos animales alternativos, como los hámsteres, sin embargo, estos ensayos no permiten evaluar la inmunidad real que pueden desarrollarlos bovinos. Con la finalidad de tener un modelo para evaluar la inmunidad real en bovinos, se realizó la inoculación experimental de becerros con tres cepas de *Leptospira*. Se utilizaron dos cepas de *Leptospira interrogans* aisladas, una de perro (cepa LOCaS46, Sv Canicola) y la segunda de rata (cepa LOVe30, Sv Icterohaemorrhagiae); así como una cepa de *L. santarosai* aislada de tejido renal de un bovino (cepa MOCA45, Sv Tarassovi). Se formaron tres grupos de tres becerros cada uno. Los becerros y sus madres no mostraban títulos de anticuerpos contra *Leptospira* en la prueba de aglutinación microscópica (AM) antes del ensayo. Dos becerros de cada grupo fueron inoculados por vía subconjuntival o por instilación ocular con los cultivos virulentos, en tres ocasiones cada 24 horas. Los animales fueron mantenidos 28 días post-inoculación y se observaron sus constantes fisiológicas, valores hemáticos, perfil bioquímico, perfil de anticuerpos anti-*Leptospira* y valores urinarios. Se realizó la necropsia al final del experimento y se colectaron muestras de orina, hígado y riñón para su cultivo, estudio histopatológico y PCR anidada para evaluar la infección con *Leptospira*. Se confirmó la infección en todos los animales

inoculados mediante PCRa. Se observó una clara seroconversión en los inoculados con LOVe30 (1:400) y moderada en los inoculados con MOCA45 (1:200), pero no en los inoculados con LOCaS46. Las lesiones en riñón e hígado fueron más graves en los inoculados con LOVe30 y MOCA45 y menos graves en los inoculados con LOCaS46. Concluimos que las cepas LOVe30 y MOCA45 son alternativas viables para utilizarse en ensayos de inmunidad contra la leptospirosis en bovinos.

Palabras clave: leptospirosis; infección experimental; bovinos; PCRa.

ABSTRACT

Leptospirosis is an infectious and contagious disease of domestic and wild mammals. In cattle it mainly causes infertility and abortions, representing important economic losses. Infected animals are the main source for environmental contamination and infection for other susceptible animals and humans. Leptospirosis is prevented with hygiene measures, as well as with the application of specific immunogens. Leptospiral surface proteins that can stimulate robust immunity in animals are currently being evaluated. The potency of this type of vaccine is evaluated in alternative animal species, such as hamsters, however, these assays do not evaluate the real immunity that can be mounted in bovines. To evaluate the real immunity in cattle, the experimental inoculation of calves with three strains of *Leptospira* was performed. Two isolated strains of *Leptospira interrogans* were used, one from a dog (strain LOCaS46, Sv Canicola) and the second from a rat (strain LOVe30, Sv Icterohaemorrhagiae); as well as a strain of *L. santarosai* isolated from bovine kidney tissue (strain MOCA45, Sv Tarassovi). Three groups of three calves each were used. The calves and their mothers did not show any antibody titers against *Leptospira* in the microscopic agglutination test (AM) before the trial. Two calves from each group were inoculated subconjunctivally or by ocular instillation with the virulent cultures, three times once a day. The animals were kept 28 days post-inoculation and their physiological constants, hemogram, biochemical profile, anti-*Leptospira* antibody profile and urinary values were observed. Necropsy was performed at the end of the experiment and urine, liver and kidney samples were collected for culture, histopathological study, and nested PCR to evaluate *Leptospira* infection. Infection was confirmed in all inoculated animals by nested PCR. A clear seroconversion was observed in those inoculated with LOVe30 (1:400) and moderate in those inoculated with MOCA45 (1:200), but not in those inoculated

with LOCaS46. Kidney and liver lesions were more severe in the calves inoculated with LOVe30 and MOCA45 and less severe in the calves inoculated with LOCaS46. We conclude that the LOVe30 and MOCA45 strains are viable alternatives to be used in bovine immunity tests against leptospirosis.

Keywords: leptospirosis; experimental infection; bovine; nPCR.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| Aspectos históricos | 1 |
| <i>Leptospira</i> el agente etiológico de la leptospirosis | 4 |
| Leptospirosis en el ganado bovino | 7 |
| Diagnóstico | 9 |
| Inmunización | 17 |
| Estudios de leptospirosis experimental en bovinos | 21 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 23 |
| 3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN | 24 |
| Objetivo general | 24 |
| Objetivos específicos | 24 |
| 4. HIPÓTESIS | 24 |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS | 24 |
| Aprobación del proyecto | 24 |
| Lugar y tiempo del estudio | 25 |
| Animales de experimentación | 25 |
| Cepas de <i>Leptospira</i> | 26 |
| Reactivación de la virulencia de las cepas | 26 |

| | |
|---|-----------|
| Preparación de los inóculos | 27 |
| Infección experimental | 27 |
| Colección de muestras | 28 |
| Estandarización de la prueba PCRa | 31 |
| Análisis histopatológico. | 34 |
| 6. RESULTADOS | 34 |
| Activación de virulencia en hámsteres | 34 |
| Estandarización de la prueba PCR anidada. | 38 |
| Infección experimental en becerros | 40 |
| 7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES | 54 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 63 |
| 9. ANEXOS | 86 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|---|-----------|
| Cuadro 1. Clasificación de <i>Leptospira</i> obtenida con base en la comparación de secuencias de 1,371 genes (Vincent, Schiettekatte, et al., 2019) | 6 |
| Cuadro 2. Antibióticos para medios de cultivo para el aislamiento de <i>Leptospira</i> | 11 |
| Cuadro 3. Cronograma experimental aplicado a los becerros | 29 |
| Cuadro 4. Dosis de los inóculos aplicados a becerros de los tres grupos experimentales | 30 |
| Cuadro 5. Iniciadores empleados para PCRa | 32 |
| Cuadro 6. Títulos de anticuerpos en la prueba de AM de sueros de los hámsteres infectados experimentalmente | 37 |
| Cuadro 7. Cantidad de ADN por dilución en las tres cepas: LOCaS46, LOVe30 y MOCA45 | 39 |
| Cuadro 8. Resultados de AM de sueros de becerros del grupo LOCaS46 | 41 |
| Cuadro 9. Resultados de AM de sueros de becerros del grupo LOVe30 | 42 |
| Cuadro 10. Resultados de AM de sueros de becerros del grupo MOCA45 | 43 |

| | |
|---|-----------|
| <i>Cuadro 11.</i> Resultados de PCRa de las diferentes muestras colectadas | 51 |
| <i>Cuadro12.</i> Secuencia del gen <i>gspD</i> y los fragmentos amplificados en la PCRa | 86 |
| <i>Cuadro 13.</i> Secuencia del gen <i>secY</i> de <i>L. interrogans</i> sv <i>Can</i> y los fragmentos amplificados en la PCRa (Basado en <i>cepa Hond Utrecht IV</i>) | 87 |
| <i>Cuadro 14.</i> Secuencia del gen <i>secY</i> de <i>L. interrogans</i> sv <i>Ict</i> y los fragmentos amplificados en la PCRa (Basado en <i>cepa RGA</i>) | 88 |
| <i>Cuadro 15.</i> Secuencia del gen <i>secY</i> de <i>L. santarosai</i> y los fragmentos amplificados en la PCRa (Basado en <i>cepa U83</i>) | 88 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Figura 1. <i>Infección experimental</i> | 28 |
| Figura 2. Necropsia de hámster infectado con LOCaS46 | 35 |
| Figura 3. Lesiones pulmones macroscópicas de hámsteres | 35 |
| Figura 4. PCRa del gen <i>gspD</i> con ADN de las cepas LOCaS46, LOVe30 y MOCA45 | 38 |
| Figura 5. PCRa Diluciones de ADN con <i>gspD</i> | 39 |
| Figura 6. Hígado con bordes redondeados | 47 |
| Figura 7. Riñón con hemorragia | 48 |
| Figura 8. Nefritis intersticial | 49 |
| Figura 9. Lesiones histológicas en hígado | 50 |
| Figura 10. PCRa de Hígado de becerros con iniciadores <i>gspD</i> | 52 |
| Figura 11. PCRa de riñones de becerros con iniciadores <i>gspD</i> | 52 |
| Figura 12. PCRa de hígado de becerros con iniciadores <i>secY</i> | 53 |
| Figura 13. PCRa de riñones de becerros con iniciadores <i>secY</i> | 53 |

ABREVIATURAS Y SIGLAS

| | |
|----------------|---|
| adk | Gen de la adenilato quinasa |
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico |
| AIF | Adyuvante Incompleto de Freund |
| AM | Aglutinación Microscópica |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| AUT | Serovariedad Autumnalis |
| B1 | Becerro 1 del grupo 1 (LOCaS46) |
| B2 | Becerro 2 del grupo 1 (LOCaS46) |
| B4 | Becerro 4 del grupo 2 (LOVe30) |
| B5 | Becerro 5 del grupo 2 (LOVe30) |
| B7 | Becerro 7 del grupo 3 (MOCA45) |
| B8 | Becerro 8 del grupo 3 (MOCA45) |
| BAL | Serovariedad Ballum |
| BC3 | Becerro control 3 del grupo 1 (LOCaS46) |
| BC6 | Becerro control 6 del grupo 2 (LOVe30) |
| BC9 | Becerro control 9 del grupo 3 (MOCA45) |
| BoHV-1 | Herpes Virus Bovino tipo |
| BQ | Perfiles Bioquímicos/Bioquímica sanguínea |
| BRSV | Virus Respiratorio Sincitial Bovino |
| BVD | Diarrea Viral Bovina |
| CAN | Serovariedad Canicola |
| CEIEPAA | Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano |
| CF | Constantes fisiológicas |
| CO | Campo Oscuro |

| | |
|---------------|---|
| COP | Serovariedad Copenhageni |
| DL50 | Dosis Letal 50% |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| ELISA | Ensayo Inmuno-absorbente ligado a enzimas |
| EMJH | Ellinghausen-McCullough modificado por Johnson y Harris |
| FMVZ | Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia |
| G1 | Grupo1 |
| G2 | Grupo 2 |
| G3 | Grupo 3 |
| GRI | Serovariedad grippotyphosa |
| GrILlep | Grupo de Investigación en <i>Leptospira</i> y Leptospirosis |
| gryB | Gen de la subunidad B de la girasa |
| gspD | Gen de la proteína “D” del Sistema de Secreción tipo 2 |
| GspD | Proteína “D” del Sistema de Secreción Tipo 2 |
| GspDLC | Proteína GspD de <i>Leptospira</i> serovariedad Canicola |
| HA | Hidróxido de Aluminio |
| HG | Hemograma |
| HPJ | Serovariedad Hardjo |
| HyE | Tinción de Hematoxilina-eosina |
| IBR | Rinotraqueítis Infecciosa Bovina |
| IBT | Instituto de Biotecnología |
| icdA | Gen de la Isocitrato deshidrogenasa A |
| IC | Inmunocromatografía |
| ICNB | International Committee on Nomenclature of Bacteria |
| ICT | Serovariedad Icterohaemorrhagiae |
| IE | Infección experimental |
| IFN- γ | Interferón gamma |
| IgM | Inmunoglobulina M |
| IL | Interleucina |

| | |
|----------------|--|
| Inst | Vía instilación |
| IP | Vía intraperitoneal |
| Len | Proteínas leptospirales similares a la endostatina |
| lig | Gen de la proteína semejante a inmunoglobulina |
| Lig | Proteínas semejantes a inmunoglobulinas |
| LPS | Lipopolisacárido |
| MIN | Serovariedad Mini |
| MLST | Multilocus Sequencing Typing |
| NA | No aplica |
| P1 | Patógenas 1 |
| P2 | Patógenas 2 |
| pb | Longitud del amplificado en pares de bases |
| PBMC | Células Mononucleares de Sangre Periférica |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| PCRa | Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada |
| PI3 | Parainfluenza 3 |
| PME's | Proteínas de Membrana Externa |
| POM | Serovariedad Pomona |
| PRR | Receptores Reconocedores de Patrones |
| PYR | Serovariedad Pyrogenes |
| qPCR | PCR en tiempo real |
| rARN | ARN ribosomal |
| rGspDLC | Proteína recombinante GspD de <i>Leptospira</i> serovariedad Canicola |
| rrs2 | Subunidad 16S del ARNr |
| RCF | Fuerza centrífuga relativa |
| s | Segundos |
| S1 | Saprófitas 1 |
| S2 | Saprófitas 2 |

| | |
|----------------|---|
| SC | Vía subcutánea |
| Sco | Vía subconjuntival |
| secY | Gen de la Pre-proteína SecY translocasa |
| SecY | Pre-proteína SecY translocasa |
| SEJ | Serovariedad sejroe |
| SICUAE | Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales |
| Sv | Serovariedad |
| T2S | Sistema de Secreción Tipo II |
| TAR | Serovariedad Tarassovi |
| UA | Urianálisis |
| UNAM | Universidad Nacional Autónoma de México |
| USD | Dólares de los Estados Unidos de América |
| USEDICO | Unidad de Servicios de Diagnóstico y Constatación |
| VA | Virulencia alta |
| VB | Virulencia baja |
| VM | Virulencia media |
| Vol | Volumen |



1. INTRODUCCION

Aspectos históricos

El médico alemán Adolf Weil en el año 1886 realizó la descripción clínica de una enfermedad que se caracterizaba por pacientes que cursaban con ictericia, esplenomegalia, disfunción renal y conjuntivitis, signos característicos de la leptospirosis (Weil, 1886). Stimson en 1907, fue el primero en realizar la descripción de una bacteria en los tejidos de un paciente que murió de “fiebre amarilla” (leptospirosis). La muestra colectada fue del parénquima renal y fue teñida con la técnica de Levaditi, que resalta a la espiroqueta de color negro debido a su componente principal, el nitrato de plata. Stimson le dio al nuevo microorganismo el nombre de “*Spirocheta interrogans*” por su morfología parecida a un signo de interrogación (Stimson, 1907). En 1915 se describió la etiología de la enfermedad casi de manera simultánea en Japón y Alemania. En Japón, Inada e Ido detectaron en mineros enfermos, espiroquetas y anticuerpos específicos en la sangre, además de una evidente ictericia, anemia, conjuntivitis y hemorragias (Inada, 1915). Por otro lado dos grupos de médicos alemanes, uno formado por Uhlenhuth y Fromme (Uhlenhuth, 1915) y el otro por Hubener y Reiter (Hubener, 1915) estudiaron a soldados alemanes afectados por la “enfermedad francesa” en las trincheras del noreste de Francia. Infectaron a cobayos con la sangre de los soldados y después lograron observar las mismas espiroquetas en la sangre de los animales. La importancia del tipo de ocupación como factor de riesgo se reconoció de manera temprana, así se han dado denominaciones diversas según sus características epidemiológicas, clínicas, territoriales, de las especies afectadas, duración de la estacionalidad, entre otras. Dichas características se han relacionado con diferentes serovariedades según el caso, por ejemplo: “Enfermedad de Weil” y “Fiebre amarilla” relacionadas con la serovariedad (Sv) Icterohaemorrhagiae, “Fiebre de los arrozales” con Bataviae, “Enfermedad de las henificadoras”, “Enfermedad de las porquerizas” con Pomona, “Enfermedad de los manipuladores de pescados”, “Ictericia

enzóotica”, “Enfermedad de Stuttgart” con Canicola en Europa, “Ictericia hemorrágica”, “Ictericia infecciosa”, “Agua roja”, “Fiebre de los siete días” con Hebdomadis en Japón, “Fiebre otoñal japonesa” con Autumnalis, “Fiebre de los ratones” con Ballum, “Tifus canino”, “Fiebre de cieno”, “Fiebre de los pantanos” con Grippytyphosa en los trópicos, “Fiebre del agua”, “Fiebre de los cosechadores”, “Fiebre de los campos”, entre otros (Ferguson, 1993). La relación entre la leptospirosis en perros y la transmisión a humanos, se reconoció cuando Krumbein y Frieling en 1916 describieron dos casos de militares que tuvieron contacto con sangre de un perro enfermo con aparente ictericia y que posteriormente enfermaron, presentando síntomas como somnolencia severa, alucinaciones, petequias en abdomen y piernas, dolores corporales, vómito, pérdida del apetito, fatiga, fiebre, e ictericia (Krumbein y Frieling, 1916). Krivacek, en 1924, reportó el hallazgo de espiroquetas en 17 de 21 perros enfermos de “tifus canino”, empleando el método de Levaditi en los cortes histológicos de riñón de dichos animales (Krivacek, 1924). Klarenbeek y Schüffner, en 1933, reportaron el aislamiento de la cepa canina Hond Utrecht IV en perros en Holanda, perteneciente a la serovariedad Canicola (Klarenbeek y Schüffner, 1933). La leptospirosis en el ganado fue reconocida algunos años después, en un inicio, Mikhin y Azinov en 1935, describieron la leptospirosis bovina en el Cáucaso Norte, en Rusia (Mikhin y Azinov, 1935), posteriormente fue denominada “fiebre amarilla infecciosa del ganado” (Semskov, 1940) y entre 1941-1942 aislaron al agente en colaboración con Salikow. A este agente lo denominaron “*Leptospira ictero-haemoglobinuria vitolorum*” (Mikhin, et al., 1941). Casi simultáneamente Terskikh en 1940-1942, también en Rusia, estudió la etiología de la “ictericia infecciosa de los bovinos”. Aisló leptospirosis de casos de leptospirosis humana y animal y la denominó “*Leptospira vitulina*” (*vitulus*: latín = becerro) (Terskikh, 1941). Kathe en 1943, en Alemania reportó casos de bovinos infectados por *Leptospira* Sv Grippytyphosa (Kathe, 1943). En 1943 en South Queensland Australia, Johnson reconoció la infección bovina, además de la transmisión a humanos originadas por la Sv Pomona al ser aislada de un hombre enfermo que trabajaba la tierra con bueyes y *Leptospira mitis* la cual se describió como una nueva serovariedad (Johnson, 1950). Sin

embargo, el nombre de la serovariedad Mitis ya había sido utilizado por Mino para la identificación de cepas de *Leptospira* aisladas en el norte de Italia (Mino, 1938); un año después, en 1939 Gispén y Schüffner identificarían a esta cepa como la Sv Bataviae y el nombre de Mitis fue rechazado tanto para las cepas australianas como para las italianas (Schüffner, *et al.*, 1939). Savino y Rennella en 1944 aislaron 2 especies de leptospiras de cerdos en Argentina que eran infecciosas para el humano, y las llamaron *Leptospira suis* y *L. hyos*; el primero fue reconocida por los mismos autores tiempo después como la ya conocida Sv Pomona; la segunda creían que era una nueva especie para la que propusieron el nombre Hyos (Savino y Rennella, 1954). Babudieri en 1951 demostró con pruebas de adsorción cruzada que Hyos era serológicamente idéntico a la cepa Mitis Johnson y que tenían la misma constitución antigénica y se consideró que el nombre Hyos era el epíteto legítimo más antiguo de la nueva serovariedad representado por esa cepa (Babudieri, 1951). En 1938 Tarassov aisló, en la región de Primoria de la Unión Soviética, una cepa de *Leptospira* de un paciente llamado Perepelitsin; los síntomas y signos del cuadro clínico de dicha infección fueron descritos más tarde por Terskikh en 1941. Después de la muerte de Tarassov, la cepa fue estudiada por Kiktenko y Ananyin (1941), quienes encontraron que era diferente de otras cepas y la designaron como *Leptospira* DV-A. Varfolomeeva comparó la cepa mediante pruebas de absorción cruzada con la cepa Mitis Johnson y sugirió el nombre de Sv Tarassovi (Varfolomeeva, 1958). DV-A es una abreviatura de "Dalnyj Vostok" (= Lejano Oriente). Como el uso de abreviaturas no está permitida, el Subcomité de Taxonomía de *Leptospira*, perteneciente al Comité Internacional de Nomenclatura de Bacterias (ICNB, International Committee on Nomenclature of Bacteria), decidió en la reunión de Moscú de 1966 adoptar el nombre de serovariedad Tarassovi (anteriormente llamada Mitis, luego Hyos) (Turner, 1971b, 1971a). Este nombre apareció ya en la lista de serovariedades de 1967 con "Perepelicin" como nombre de la cepa de referencia (OMS, 1967). Dado que Perepelicin es una transcripción incorrecta del nombre escrito en ruso del paciente, su transcripción correcta Perepelitsin ahora se introduce como nombre de cepa y se utiliza como tal en la lista actualizada adjunta de

serovariedades. Una de las serovariedades más importantes presentes en el ganado, es la serovariedad Hardjo, aislada por primera vez a partir de ganado en 1960, en Louisiana, Estados Unidos (Roth y Galton, 1960). En México, la leptospirosis fue reconocida cuando en 1919 hubo reportes de un brote de fiebre amarilla en Yucatán México; de inmediato fue notificado el Dr. Hideyo Noguchi, quien en el hospital O´Horán en la ciudad de Mérida realizó frotis sanguíneos de los pacientes, obteniendo el aislamiento de un caso, siendo este el primer caso de leptospirosis humana reportado en México (Noguchi y Kligler, 1920). Sin embargo en 1958 se reconoció el primer brote epidémico de leptospirosis en México, en las comunidades de Kinchil y Tetiz, en la Península de Yucatán; desde entonces se observan casos de leptospirosis durante todo el año, con un aumento de casos en los meses lluviosos cuando la morbilidad aumenta, debido a que se favorece la supervivencia de *Leptospira* en el ambiente húmedo (García, 2004). Diversos estudios serológicos dieron indicios sobre las serovariedades presentes en los bovinos, en donde las serovariedades Hardjo, Tarassovi, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Grippytyphosa, Sejroe y Wolffi fueron las principalmente detectadas (Chávez, 2006). Además, se han obtenido aislamientos de cepas mexicanas, como es el caso de la cepa H89 de Hardjoprajitno (Moles Cervantes, *et al.*, 2002), Grippytyphosa (CAL4), Hardjoprajitno (CAL6), Mini (CAL7) y Tarassovi (MOCA45), las cuales han sido identificadas mediante Aglutinación Microscópica (AM) cruzada y por la técnica de MLST (Multilocus Sequencing Typing) (Carmona-Gasca, *et al.*, 2011).

***Leptospira* el agente etiológico de la leptospirosis**

La leptospirosis es una enfermedad infectocontagiosa, multisistémica, de amplia distribución en el mundo (OMS, 2008), causada por más de 270 serovariedades patógenas del género *Leptospira* (Guernier, *et al.*, 2018). La clasificación en serovariedades tiene su fundamento en la antigenicidad del lipopolisacárido (LPS), considerado su principal antígeno de superficie (Vinh, *et al.*, 1989). *Leptospira* pertenece al Phylum y Clase Spirochaetes, Orden Spirochaetales y Familia Leptospiraceae, donde se encuentran incluidos los géneros *Leptospira*, *Turneriella* y

Leptonema (Cavalier-Smith, 2002). Las especies de *Leptospira* se clasificaron hasta hace unos años según su diversidad genética y su patogenicidad en especies patógenas, de patogenicidad intermedia y saprófitas (Morey, *et al.*, 2006). Sin embargo, en 2019 fue presentada la clasificación más actualizada que incluye un total de 64 especies, 38 patógenas subdivididas en dos subgrupos P1 y P2 y 26 saprófitas con los subgrupos S1 y S2 (Cuadro 1). Dicha clasificación fue obtenida con base en la comparación de la secuencia de 1,371 genes (Vincent, *et al.*, 2019). Las especies patógenas afectan principalmente a mamíferos tanto domésticos como silvestres y de manera accidental al humano. Entre las especies patógenas, existen algunas adaptadas a diferentes especies animales y otras no adaptadas a especie. Usualmente las serovariedades adaptadas se asocian con infecciones moderadas de curso crónico, excepto bajo ciertas circunstancias como inmunosupresión o cuando existe una infección concomitante, mientras que las serovariedades no adaptadas usualmente causan infecciones más graves de curso agudo (Adler y de la Peña-Moctezuma, 2010; Goarant, *et al.*, 2022) *Leptospira* es una bacteria con forma espiral, que presenta una longitud de 5 a 20 μm por 0.1 a 0.2 μm de diámetro, posee dos flagelos periplásmicos con inserciones polares y los extremos con forma de gancho o espiral, que le proporcionan la capacidad de moverse (Swain, 1957; Picardeau, 2017). Tienen una organización estructural similar a la de bacterias Gram negativas, presenta una membrana externa con su LPS, una membrana interna y un espacio periplásmico intermedio que contiene peptidoglicano, responsable de la morfología característica (Cameron, 2015). Sin embargo, muchos estudios previos revelaron que el LPS de *Leptospira* tiene una actividad endotóxica más baja que la de los bacilos entéricos como el de *Escherichia coli* por ejemplo (Isogai, *et al.*, 1986; Isogai, *et al.*, 1989; Vinh, *et al.*, 1989). La pared celular de *Leptospira* contiene diferentes proteínas de superficie, varias de ellas de naturaleza lipoproteica (lipoproteínas) como por ejemplo LipL21 (Cullen, *et al.*, 2003), LipL32 (Haake, *et al.*, 2000), LipL36 (Haake, *et al.*, 1998), LipL41 (Shang, *et al.*, 1996), LipL45 (Matsunaga, *et al.*, 2002), LipL46 (Cullen, *et al.*, 2002; Matsunaga, *et al.*, 2006), LipL48 (Haake y Matsunaga, 2002), la proteínas tipo OmpA Loa22 (Koizumi y Watanabe, 2003), además

Cuadro 1. Clasificación de *Leptospira*. Obtenida con base en la comparación de secuencias de 1,371 genes (Vincent, *et al.*, 2019).

| Patógenas | | Saprófitas | |
|--------------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------------|
| P1 (17) | P2 (21) | S1 (21) | S2 (5) |
| <i>L. adleri</i> | <i>L. andrefontaineae</i> | <i>L. bandrabouensis</i> | <i>L. idonei</i> |
| <i>L. alexanderi</i> | <i>L. broomii</i> | <i>L. biflexa</i> | <i>L. ilyithenensis</i> |
| <i>L. alstonii</i> | <i>L. dzoumogneensis</i> | <i>L. bourretii</i> | <i>L. kobayashii</i> |
| <i>L. barantonii</i> | <i>L. fainei</i> | <i>L. bouyouniensis</i> | <i>L. ognonensis</i> |
| <i>L. borgpetersenii</i> | <i>L. fletcheri</i> | <i>L. brenneri</i> | <i>L. ryugenii</i> |
| <i>L. dzianensis</i> | <i>L. fluminis</i> | <i>L. congkakensis</i> | |
| <i>L. ellisii</i> | <i>L. haakeii</i> | <i>L. ellinghauseni</i> | |
| <i>L. gomenensis</i> | <i>L. hartskeerlii</i> | <i>L. harrisiae</i> | |
| <i>L. interrogans</i> | <i>L. inadai</i> | <i>L. jelokensis</i> | |
| <i>L. kirschneri</i> | <i>L. johnsonii</i> | <i>L. kanakyensis</i> | |
| <i>L. kmetyi</i> | <i>L. koniamboensis</i> | <i>L. kemamanensis</i> | |
| <i>L. mayottensis</i> | <i>L. langatensis</i> | <i>L. levettii</i> | |
| <i>L. noguchii</i> | <i>L. licerasiae</i> | <i>L. meyeri</i> | |
| <i>L. putramalaysiae</i> | <i>L. neocaledonica</i> | <i>L. montravelensis</i> | |
| <i>L. santarosai</i> | <i>L. perolatii</i> | <i>L. mtsangambouensis</i> | |
| <i>L. tipperaryensis</i> | <i>L. saintgironisae</i> | <i>L. noumeaensis</i> | |
| <i>L. weilii</i> | <i>L. sarikeiensis</i> | <i>L. perdikensis</i> | |
| | <i>L. selangorensis</i> | <i>L. terpstrae</i> | |
| | <i>L. semungkikensis</i> | <i>L. vanthieli</i> | |
| | <i>L. venezuelensis</i> | <i>L. wolbachii</i> | |
| | <i>L. wolffii</i> | <i>L. yanagawae</i> | |

P1: Patógenas 1, **P2:** Patógenas 2, **S1:** Saprófitas 1, **S2:** Saprófitas 2, **():** Número de especies que componen cada grupo.

de proteínas semejantes a inmunoglobulinas (Lig) como LigA (Palaniappan, *et al.*, 2002b), LigB (Matsunaga, *et al.*, 2005) y LigC (Matsunaga, *et al.*, 2003), y otras adhesinas como las proteínas leptospirales similares a la endostatina (Len), LenA (antes LfhA y Lsa24) (Verma, *et al.*, 2006), LenB, LenC, LenD, LenE y LenF (Stevenson, *et al.*, 2007).

Además de proteínas funcionales como la porina OmpL1 (Haake, *et al.*, 1993), Omp52 (Hsieh, *et al.*, 2005) y los componentes del Sistema de Secreción Tipo II (T2S) (Sandkvist, 2001; Zeng, *et al.*, 2013). El T2S es un sistema Sec dependiente presente en bacterias Gram negativas. A través de esta ruta se secretan proteínas como proteasas, celulasas, pectinasas, fosfolipasas, lipasas y toxinas que contribuyen a daño celular, pueden ayudar en la colonización o destrucción de tejidos al derrotar las defensas del huésped y / o proporcionar nutrientes (Sandkvist, 2001). También, el T2S se ha relacionado con la biogénesis de la membrana externa y de la cápsula (Francetic, *et al.*, 2000).

Leptospirosis en el ganado bovino

El ganado lechero bovino es afectado de manera importante por la leptospirosis, reflejándose en un impacto económico asociado con infertilidad, agalactia, tormentas de abortos, mortinatos y nacimiento de crías débiles (Adler y de la Peña-Moctezuma, 2010). En la infección pueden intervenir serovariedades adaptadas al hospedador que generalmente se asocian con infecciones subclínicas, o no adaptadas que se asocian con presentaciones clínicas severos (infecciones incidentales) y son usualmente transmitidas por animales de otras especies como ratas o perros. En bovinos la serovariedad adaptada predominante es Hardjo, particularmente los subtipos Hardjobovis (*L. borgpetersenii*) y Hardjoprajitno (*L. interrogans*) (Chideroli, *et al.*, 2016). Las serovariedades Autumnalis, Australis, Canicola, Grippytyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Pomona, Pyrogenes, Sejroe y Tarassovi son serovariedades involucradas en infecciones incidentales en bovinos (Ellis y Michna, 1976; Milner, *et al.*, 1980). La transmisión puede ser directa o indirecta, entre los bovinos la Sv Hardjo se transmite principalmente por el contacto directo a través de la orina, flujo uterino posterior a un aborto, placentas contaminadas, o transmisión venérea entre individuos infectados y susceptibles e incluso a través de la vía transplacentaria (Loureiro y Lilenbaum, 2020). La transmisión indirecta juega un papel mucho mayor en las infecciones con otras serovariedades no adaptadas a los bovinos y que producen infecciones incidentales a través de la exposición a un entorno

contaminado con material infeccioso, generalmente uno que favorezca la supervivencia de las leptospiras fuera del hospedero, y de una manera que facilite el contacto cercano entre el portador y los animales susceptibles (Ellis, 1994). La vía de entrada de *Leptospira* al hospedero es a través de las mucosas (conjuntival, oral, nasal, vaginal y del pene), o a través de abrasiones en piel reblandecida por contacto excesivo con agua (Ellis, 1984; Ellis, 2015). El periodo de incubación en promedio es de 7 a 12 días, y puede durar hasta un mes. Posterior a la entrada a través de mucosas, se presenta una replicación en el torrente sanguíneo de animales sin anticuerpos, leptospiremia, que puede durar entre 3-10 días. *Leptospira* se multiplica y disemina en prácticamente todos los tejidos, particularmente el hígado, bazo, riñones, tracto reproductor, ojos y sistema nervioso central y por lo tanto se pueden aislar de la sangre y órganos durante este período (Ellis, *et al.*, 1985b). La fase de leptospiremia termina con la aparición de anticuerpos, aproximadamente 10 a 14 días después de la infección, que alcanzan sus niveles máximos alrededor de la 3ª a 6ª semana y continuando con un descenso gradual; títulos bajos de anticuerpos pueden ser detectables durante varios años (Ellis, 2015). Las leptospiras son capaces de alojarse en los túbulos renales proximales, evadiendo así al sistema inmune, donde se replican y se eliminan por la orina de manera intermitente, leptospiruria, durante meses o años (Ellis, *et al.*, 1985c). La enfermedad, cuando tiene una presentación clínica aguda y grave, incluye signos como: pirexia, anemia hemolítica, hemoglobinuria, ictericia, aborto, agalactia, mastitis, y ocasionalmente meningitis y muerte, principalmente la encontramos en animales jóvenes asociada con infecciones incidentales (Ellis, 2015). La fase crónica de la enfermedad en la infección por la serovariedad Hardjo (ambos subtipos) suele ser persistente y subclínica, con bajos títulos de anticuerpos y pudiendo pasar desapercibida (Ellis, *et al.*, 1981). El aborto generalmente ocurre en el último tercio de la gestación, de 1 a 6 semanas (Pomona) o de 4 a 12 semanas (Hardjo) después de la fase aguda de la infección, pero estos animales con frecuencia no muestran evidencia clínica de infección aguda (Ellis, 1994). La agalactia puede presentarse en el 1 al 50% del hato dependiendo de la inmunidad del rebaño y las prácticas de manejo,

presentándose brotes que pueden pasar desapercibidos (Higgins, *et al.*, 1980). También se sabe de la persistencia crónica en la glándula mamaria y de la eliminación de leptospiras por leche durante el periodo de mastitis (Thiermann, 1982). Se han observado tasas de concepción reducidas asociadas con la infección por *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo, así como la muerte fetal, abortos al final de la gestación, el nacimiento de crías débiles y la retención de membranas fetales (Ellis, *et al.*, 1985a; Ellis, 1994; Smyth, *et al.*, 1999). Además, se han podido encontrar anticuerpos contra *Leptospira* en fetos posterior al aborto y pueden ocurrir descargas uterinas de la bacteria. También, se ha encontrado la persistencia de leptospiras en el oviducto y el útero de hembras no gestantes y en testículos, epidídimo y vesículas seminales de los machos sugiriendo una posible transmisión sexual (Ellis, *et al.*, 1986a; Ellis, *et al.*, 1986b). Un estudio *in vitro* demostró que las leptospiras tienen la capacidad de adherirse y penetrar en la zona pelúcida y entrar en las células embrionarias de vacas (Bielanski y Surujballi, 1998). Se ha reportado una asociación de la infección por *Leptospira* con la retención de membranas fetales (Ellis, *et al.*, 1985b), y en descargas vaginales 8 días después del aborto o del parto (Ellis, *et al.*, 1985c). En una infección experimental (IE) con *Leptospira interrogans*, serovariedad Hardjoprajitno en vacas gestantes, se evaluó la presencia de terneros muertos o nacidos débiles, y se observaron pesos significativamente más bajos que los controles no infectados (Smyth, *et al.*, 1999).

Diagnóstico

Aislamiento

El diagnóstico definitivo para la leptospirosis es el aislamiento bacteriano (Palmer y Zochowski, 2000; Levett, 2001; Wuthiekanun, *et al.*, 2007); sin embargo, existen complicaciones para su obtención; los cultivos de leptospiras deben ser observados en un microscopio de campo oscuro (CO), su desarrollo es muy tardío y puede ir desde días hasta meses, a pesar de las condiciones óptimas de crecimiento, entorpeciendo el diagnóstico temprano (Levett, 2001; Lourdault, *et al.*, 2009). Además, las muestras de tejido post mortem deben procesarse lo más pronto posible, ya que las leptospiras

pueden no resistir las condiciones desfavorables que se desarrollan en un cadáver y corren el riesgo de contaminarse (Chappel, *et al.*, 1992; Brown, *et al.*, 2003a). Las muestras para aislamiento pueden ser fluidos o tejidos corporales como la sangre, los riñones y el hígado de animales infectados (Cameron, 2015). Además de la contaminación por otros microorganismos, también pueden ocurrir serovariedades mixtas en cultivos, especialmente en casos de aislamientos del medio ambiente y animales portadores (Babudieri, 1968; Kingscote, 1985). El aislamiento a partir de sangre se debe realizar en la primera semana de la enfermedad, durante la leptospiremia (Wuthiekanun, *et al.*, 2007), y se debe inocular 100-200 μ l de sangre en 5-10 ml de medio EMJH (Ellinghausen-McCullough modificado por Johnson y Harris) semisólido o líquido, agregar demasiada sangre o tejido puede inhibir el crecimiento de las leptospiras (Cameron, 2015). En el caso de muestras de orina, también se puede realizar aislamiento recolectando la orina en un recipiente estéril (Zuerner, 2006), y deben procesarse rápidamente mediante neutralización del pH y/o centrifugación y resuspensión en medio de cultivo, ya que la tasa de supervivencia disminuye después de un período breve. Las muestras se controlan por microscopía para determinar el crecimiento a intervalos semanales durante un periodo de hasta 6 meses. (Turner, 1970; Nervig y Ellinghausen Jr, 1978). El aislamiento de *Leptospira* es un confirmatorio definitivo, pero difícil de lograr por las complicaciones de contaminación. Los medios de cultivo más empleados para el aislamiento de *Leptospira* son los líquidos y semisólidos; el medio EMJH es el medio líquido más utilizado para el cultivo de leptospiras, desarrollado por Ellinghausen y McCullough (Ellinghausen y McCullough, 1965) y modificado por Johnson y Harris (Johnson y Harris, 1967; Myers, 1985); que también puede ser usado de manera semisólida (agar ultrapuro 0.1-0.2%) (Johnson y Seiter, 1976); y medios suplementados con Tween 80 o 40 y con varios niveles de suero de conejo (0.4-8%). Si se va a usar suero como factor de enriquecimiento, este debe ser de conejos seronegativos e inactivarse por calor mediante incubación durante 30 min a 56 °C. Los medios pueden ir con o sin antibacterianos como agentes selectivos, algunos de ellos pueden ser empleados en cocteles como se muestra en el Cuadro 2. Los

Cuadro 2. Antibióticos para medios de cultivo para el aislamiento de *Leptospira*.

| Antibióticos | Dosis | Referencia |
|-------------------------|--------------|-------------------------------------|
| Sulfatiazol | 50 µg/ml | (Cousineau y McKiel, 1961) |
| Neomicina | 5 µg/ml | |
| Actidiona | 0.5 µg/ml | |
| Actidiona | 100 µg/ml | (Adler, <i>et al.</i> , 1986) |
| Bacitracina | 40 µg/ml | |
| 5- Fluorouracilo | 250 µg/ml | |
| Neomicina | 2 µg/ml | |
| Polimixina B | 0.2 µg/ml | |
| Rifampicina | 10 µg/ml | |
| 5- Fluorouracilo | 400 µg/ml | |
| Cloranfenicol | 5 µg/ml | (Freitas, <i>et al.</i> , 2004) |
| Ácido Nalidíxico | 50 µg/ml | |
| Neomicina | 10 µg/ml | |
| Vancomicina | 10 µg/ml | |
| 5- Fluorouracilo | 300 µg/ml | (Miraglia, <i>et al.</i> , 2009) |
| Ácido Nalidíxico | 20 µg/ml | |
| Sulfametoxazol | 40µg/ml | (Chakraborty, <i>et al.</i> , 2011) |
| Trimetoprima | 20 µg/ml | |
| Anfotericina B | 5 µg/ml | |
| Fosfomicina | 400 µg/ml | |
| 5- Fluorouracilo | 100 µg/ml | |
| 5- Fluorouracilo | 100 µg/ml | (Pinhata, <i>et al.</i> , 2018) |
| Neomicina | 4 µg/ml | |

medios selectivos inhiben una gran cantidad de contaminantes, incluidos bacilos, cocos Gram positivos y negativos y hongos, y son recomendados para su uso en muestras

ambientales (Saito, *et al.*, 2013). Otro medio de cultivo usado es el Medio de Stuart, inicialmente creado por Stuart en 1946 (Stuart, 1946) y modificado por Faine en 1994 (Faine, 1994) este medio enriquecido con suero de conejo favorece el desarrollo de leptospiras, pero también es propenso a precipitar los fosfatos presentes en el medio, dificultando la visualización de bacterias en el análisis de cultivos en campo oscuro. Las leptospiras suelen crecer bien en medio semisólido, donde forman una zona densa de desarrollo denominada anillo de Dinger (Lawrence, 1951), este desarrollo depende de la cepa, algunas pueden tardar hasta 6 meses en su desarrollo (Cameron, 2015). Los medios sólidos suelen ser menos utilizados para el aislamiento de *Leptospira*, por la dificultad de que algunas cepas de leptospiras patógenas exigentes puedan desarrollar, no que para algunas resulta infructuoso (Cameron, 2015). La realización de diluciones en estos medios ofrece la posibilidad óptima de un aislamiento exitoso; los cultivos deben incubarse a 28-30 °C, y pueden crecer hasta a 37°C, pero no es así a temperaturas menores, durante 26 semanas o más; el rango de pH óptimo para el crecimiento es de 7.2 a 7.6; el rendimiento se puede aumentar proporcionando aireación durante el cultivo (Faine, *et al.*, 1999; Zuerner, 2006); los cultivos deben examinarse mediante microscopía de campo oscuro cada 7-10 días y para el recuento de células se utiliza una cámara de recuento Petroff-Hausser (Faine, *et al.*, 1999). Los métodos de tinción como la inmunofluorescencia, la tinción inmuno-histoquímica o la tinción con plata (Warthin-Starry), son métodos adicionales apropiados para ser aplicados sobre los tejidos (Warthin y Starry, 1920; Ajayi, *et al.*, 2020; Saglam, *et al.*, 2022).

Aglutinación Microscópica (AM)

Los métodos comúnmente empleados para el diagnóstico de la leptospirosis son las pruebas serológicas, como son: la prueba de aglutinación microscópica (AM), considerada la prueba de referencia para la leptospirosis (Terpstra, 2003; Levett, *et al.*, 2006), el Ensayo Inmuno-absorbente ligado a enzimas (ELISA) o la Inmunocromatografía (IC) de Flujo Lateral. La prueba de AM o prueba de Martin y Petti, fue desarrollada en el Instituto Pasteur, en 1918 (Martin y Pettit, 1918); la prueba consiste en la observación por microscopía de campo oscuro la aglutinación de

cultivos vivos de *Leptospira* (de 1 a 2×10^8 células por ml) formada por la unión de las bacterias a anticuerpos presentes en el suero sospechoso (Terpstra, 2003). Esto se trabaja en una placa de poliestireno de 96 pozos y con el suero en diluciones dobles seriadas; el título de punto final de la AM está determinado por la aglutinación del 50% de leptospiras en la dilución de suero más alta, en comparación con un control sin suero; la prueba se considerará positiva a una dilución de por lo menos 1:100 (Levett, 2001). La AM es empleada como prueba de rebaño, o de manera individual, y utiliza antígenos vivos con cepas representativas de todos los serogrupos que se tenga conocimiento que existen en el país o en la región geográfica en particular (método serogrupo específico y no serovariedad específico) (Picardeau, 2013). En los bovinos existen variaciones individuales en la respuesta de anticuerpos por títulos de anticuerpos decrecientes o muy bajos al momento del aborto, por lo que se recomienda el estudio de al menos el 10% del hato para obtener información útil de la salud reproductiva del mismo (Ellis, 1994). Es importante entender la dinámica de los anticuerpos en los animales, para emitir la interpretación correcta de esta prueba. La primera respuesta serológica en animales infectados con la serovariedad Hardjo subtipo Hardjobovis es la producción de anticuerpos, iniciando por la inmunoglobulina IgM cuyos títulos en suero se elevan rápidamente y que, como se ha mencionado anteriormente, alcanzan su punto máximo a las 2-3 semanas postinfección y que posteriormente disminuyen a un nivel de indetectables (Stringfellow, *et al.*, 1983; Vinh, *et al.*, 1994). A la tercera semana postinfección se comienzan a elevar las inmunoglobulinas IgG hasta constituir el 80% de los anticuerpos detectados en la prueba de AM (Ellis, 1994). La prueba de AM no da suficientes indicios del estado de infección en que se encuentra el bovino debido a que no diferencia entre IgG e IgM, y hace necesario el empleo de un ensayo de diagnóstico que determine la clase de anticuerpos para conocer la etapa o el progreso de la infección (Morris y Hussaini, 1974). En bovinos, los anticuerpos contra *Leptospira* pueden persistir en con títulos de 1:50 a $> 1:400$ por 12 meses y hasta por 2 años (Worthington, 1982). Sin embargo, los anticuerpos aglutinantes comúnmente disminuyen con el tiempo y la sensibilidad de la

AM en la detección de estos anticuerpos en animales infectados durante más de dos años es baja (Allen *et al.*, 1982). La baja sensibilidad de la AM en general y en bovinos pudiese subestimar las cifras reales de animales infectados y que pudiese ser del doble (Prescott, *et al.*, 1988; Limmathurotsakul, *et al.*, 2012). Se ha sugerido aumentar la sensibilidad al disminuir la dilución inicial del suero para resolver el subregistro de seroprevalencia, sin embargo, esto también puede aumentar la tasa de falsos positivos (Ellis, 1983). Además, la AM es una técnica subjetiva, requiere experiencia tanto para su realización como para su análisis y es costosa (Picardeau, 2013). Un resultado de títulos de 1:100 o 1:200, puede referirse al inicio de una infección, a una infección previa o a anticuerpos vacunales, es por eso que para la confirmación de un caso de leptospirosis se requieren dos muestreos con 2 semanas de diferencia, en donde debe existir una seroconversión o aumento significativo (4 veces el título de AM) de los títulos de anticuerpos, para sugerir una infección actual por *Leptospira* (Picardeau, 2013). Los anticuerpos contra *Leptospira* pueden tardar varias semanas en ser detectables por AM (Faine, 1982). Lo que nos indica una prueba serológica es que el animal ha tenido algún contacto previo con *Leptospira*, no indica si se trata de una infección reciente, si es un portador, si se ha recuperado o si persiste eliminado el agente infeccioso. La patogenia junto con la historia clínica y los signos clínicos deben ser considerados. En la fase temprana de la infección, cuando se presentan títulos altos de anticuerpos contra el antígeno homólogo, se pueden encontrar reacciones cruzadas a títulos más bajos contra el antígeno heterólogo y en este caso el diagnóstico exacto de la serovariedad infectante deberá ser determinada mediante el aislamiento y la identificación del organismo (Sulzer CR y WL, 1978).

Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA)

El Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA) (Hornbeck, 1992) es un método analítico cuantitativo que muestra reacciones antígeno-anticuerpo a través del cambio de color obtenido mediante el uso de un conjugado ligado a enzimas y un sustrato enzimático que sirve para identificar la presencia y concentración de moléculas en fluidos biológicos (Aydin, 2015). La prueba de ELISA es una herramienta

común para el diagnóstico presuntivo de leptospirosis (Schreier, *et al.*, 2013); al analizar muestras de ganado tiene algunas ventajas sobre la AM, incluido el uso de antígenos inactivados, análisis objetivo y determinación de la clase de anticuerpos, y se ha demostrado que a pesar de tener una sensibilidad y especificidad variable, la prueba ELISA es más sensible que la AM (Cousins, *et al.*, 1985; Picardeau, 2013). El origen de la ELISA se remonta al año 1941 (Coons, *et al.*, 1941) y el método fue inventado simultáneamente por dos equipos de investigación en 1971 (Engvall, *et al.*, 1971; Van Weemen y Schuurs, 1971). Y para el año 1980, Siegle y su equipo de trabajo modificaron la prueba ELISA incorporando placas de microtitulación para identificar las concentraciones de diversas hormonas, péptidos y proteínas (Siegle, *et al.*, 1980). La prueba requiere de una lectura colorimétrica por espectroscopía que permite un análisis y una estandarización objetivos (Schreier, *et al.*, 2013). La función de la ELISA es detectar anticuerpos, lo que se conoce como ELISA indirecto, y podría dividirse además en específico de género y serogrupo, así como en ELISA de IgG o IgM (Adler, *et al.*, 1980). La producción de anticuerpos IgM se da dentro de la primera semana de la enfermedad, lo que permite su detección y un diagnóstico relativamente temprano y, por lo tanto, la oportunidad de un tratamiento específico oportuno (Levett, 2001). Una desventaja es que no puede proporcionar resultados específicos de serovariedad para grandes cantidades de muestras. También hay ELISAs que utilizan como antígenos de captura proteínas de la membrana externa (PME's) basados en proteínas recombinantes como LipL21, LipL32, LipL36, LipL41, LigA/B, OmpL1 y Loa22, que son conservadas entre las serovariedades patógenas (Flannery, *et al.*, 2001; Bomfim, *et al.*, 2005; Srimanote, *et al.*, 2008; Chalayon, *et al.*, 2011).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Por otro lado, la PCR también se usa para el diagnóstico debido a su sensibilidad que se encuentra entre las 100 y las 1,000 copias del genoma del microorganismo en estudio (Martín, *et al.*, 2015), no requiere la presencia de organismos viables directamente de las muestras y ayuda a brindar un diagnóstico temprano (Levett, *et al.*, 2006; Ooteman, *et al.*, 2006; Ahmed, *et al.*, 2009). El ADN de leptospiras se ha amplificado a partir de

suero, orina, humor acuoso, líquido cefalorraquídeo, entre otros órganos post mortem (Levett, 2004). La PCR en tiempo real (qPCR) es más rápida para interpretar, menos sensible a la contaminación, facilita el monitoreo en línea y no requiere análisis posteriores a la reacción (Ahmed, *et al.*, 2009; Picardeau, 2013; Picardeau, *et al.*, 2014). Los ensayos se dividen en dos categorías basadas en la detección de genes que están universalmente presentes en bacterias, por ejemplo, *gryB* (subunidad B de la girasa), *rrs2* (subunidad 16S del rARN), *adk* (adenilato quinasa), *icdA* (isocitrato deshidrogenasa), y *secY* (pre-proteína SecY translocasa), o la detección de genes restringidos a *Leptospira* patógenas, por ejemplo los genes *lipL21*, *lipL32*, *lipL41*, *ligA* y *ligB* codificantes de las lipoproteínas correspondientes (Smythe, *et al.*, 2002; Bourhy, *et al.*, 2011; Thaipadunpanit, *et al.*, 2011). Una PCR positiva demuestra la presencia de leptospiros patógenas, pero no permite la identificación de la serovariedad específica ni garantiza su viabilidad. El análisis de las curvas de fusión de los productos de amplificación puede permitir la identificación de la especie y la secuenciación la identificación del genotipo (Cerqueira, *et al.*, 2010; Perez y Goarant, 2010). Ha habido problemas particulares con el uso de PCR en material fetal abortado debido a la presencia de inhibidores resultantes de la autólisis tisular (Artiushin SC, *et al.*, 2012). Algunos de estos problemas se eluden al analizar el contenido del abomaso, un fluido comúnmente utilizado en el diagnóstico de otras infecciones bacterianas abortivas (Doosti y Tamimian, 2011). En muestras de orina la PCR es una técnica recomendada (Hamond, *et al.*, 2014), pero hay que tener en cuenta que existen inhibidores de la PCR presentes en la orina, que participan en la disminución de la sensibilidad y especificidad de este método (Lucchesi, *et al.*, 2004), y hay que tener en cuenta que un resultado negativo en la PCR no excluye la posibilidad de que el animal esté infectado, ya que la excreción de leptospiros en la orina se da de manera intermitente en el ganado (Adler y de la Peña-Moctezuma, 2010). Para trabajar con este tipo de muestras, el uso de una PCR en tiempo real (qPCR) es una buena prueba auxiliar para el diagnóstico de leptospirosis como causa de aborto bovino ya que sus resultados se ven en menor

medida influenciados por muestras en autólisis o con mala conservación (Grooms y Bolin, 2005; Cheuquepán, *et al.*, 2020).

Inmunización

La vacunación es la forma más efectiva y rentable para prevenir y controlar las enfermedades infecciosas, incluyendo la leptospirosis, su objetivo es inducir una respuesta inmune específica y proporcionar protección duradera contra la infección (Bey y Johnson, 1986; Lee y Nguyen, 2015). Las vacunas generalmente van adicionadas de adyuvantes que son sustancias o preparados químicos que son incorporados y aplicados junto con el antígeno y hacen más efectiva la respuesta inmune (Lee y Nguyen, 2015). Con su empleo se logra una economía de antígeno, así como el poder dirigir la respuesta inmunológica deseada (Morris Quevedo, *et al.*, 1999). Además, los adyuvantes ayudan a aumentar la estabilidad de las vacunas al hacerlas menos susceptibles a la degradación que puede ocurrir durante el almacenamiento o la inyección; e influyen en el inicio, la fuerza y la duración de las respuestas inmunes (Schijns y Lavelle, 2011). En general, los adyuvantes activan el sistema inmune innato a través de los Receptores Reconocedores de Patrones (PRR) presentes en las células inmunes. La mayoría de los adyuvantes inmunoestimulantes actúan como ligandos para los PRR y conducen a la secreción de citocinas al mejorar directamente una vía de activación (Coffman, *et al.*, 2010). Dependiendo el inmunógeno y el adyuvante se va a inducir una respuesta de linfocitos Th1 o Th2. Los Th1 implican una respuesta inmunitaria mediada por células y las principales citocinas participantes son el interferón gamma (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2) e IL-12; mientras que las células Th2 activan la respuesta inmunitaria humoral dirigida por anticuerpos para neutralizar los antígenos extracelulares y las principales citocinas participantes son IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 y posiblemente IL-10 (Spickler y Roth, 2003). Tomando en cuenta el impacto económico y en salud pública, la prevención de la leptospirosis mediante la vacunación es una acción importante para evitar o controlar la diseminación de esta enfermedad. La combinación con medidas de bioseguridad y manejo como: eliminar productos del aborto por incineración, no introducir al hato animales con antecedentes de la

enfermedad, control de roedores y perros dentro de la unidad de producción, separar animales sanos de enfermos es importante para el control de la leptospirosis. Las vacunas disponibles comercialmente para bovinos han sido suspensiones de leptospiras muertas (bacterinas), con diversas formulaciones, y han incluido de una hasta doce o más serovariedades (Martins y Lilenbaum, 2017; Sanhueza, *et al.*, 2018). Sin embargo, un problema para la prevención de la enfermedad es que se inmuniza contra serovariedades específicas, desprotegiendo de otras serovariedades patógenas, por lo que es importante seguir buscando una vacuna que sea segura, eficaz y que proteja contra un amplio espectro de serovariedades patógenas de *Leptospira*. Entre las serovariedades que podemos encontrar en las vacunas comerciales para bovinos se encuentran: Ballum, Bataviae, Bratislava, Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Sejroe, Tarassovi y Wolffi. En muchos casos, las formulaciones obedecen a resultados serológicos, sin que necesariamente se tenga evidencia del papel infectante de las serovariedades mediante aislamiento, como sucede con la serovariedad Wolffi, la cual ha sido incluida en las formulaciones siendo que no ha sido aislada nunca de muestras de bovinos, en ninguna parte del mundo (Ellis, WA, 2015; de la Peña-Moctezuma). Generalmente, estas bacterinas vienen en combinaciones con suspensiones de virus vivos modificados o inactivados del Complejo Respiratorio Bovino como el de Herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1), Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR), Diarrea Viral Bovina (BVD) Tipos I y II, el virus Parainfluenza 3 (PI3), o el Virus Respiratorio Sincitial Bovino (BRSV). Usualmente las vacunas contra la leptospirosis inician una respuesta inmune en su mayoría de tipo humoral. Sin embargo, se ha observado en bovinos vacunados con lisados de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjobovis), adicionadas con hidróxido de aluminio (HA), que logran inducir una respuesta celular importante del tipo Th1 con una destacada proliferación de linfocitos TCD4+ y T γ δ , mediada por la liberación de IFN γ (Naiman, *et al.*, 2001; Zuerner, *et al.*, 2011). Las células T γ δ generadas en respuesta a la vacunación contra *Leptospira borgpetersenii* en bovinos nos indica ser una respuesta protectora dirigida a mucosas ya que representan la mayor población de linfocitos T en el útero de

los rumiantes y estas pueden constituir hasta el 50 % de las células T circulantes en estos animales (Blumerman, *et al.*, 2007; Garfias, 2011). Cuando se desafiaron bovinos vacunados con una bacterina monovalente de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo y se compararon con animales no vacunados, ambos grupos mostraron niveles similares de IgG1, pero los vacunados presentaron el doble de la concentración de IgG2 (Naiman, *et al.*, 2002). También se ha comparado la respuesta inmunológica de una bacterina monovalente de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjobovis), contra un inmunógeno polivalente con las serovariedades Hardjo, Canicola, Pomona, Grippytyphosa e Icterohaemorrhagiae; la vacuna monovalente indujo la producción de IFN γ e inmunoglobulinas IgG1 e IgG2, además de que existió una producción de IFN γ al enfrentar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con el antígeno tanto de Hardjobovis como con Grippytyphosa, pero no sucedió así con la vacuna polivalente, la cual tuvo valores similares a los controles (Brown, *et al.*, 2003b). A pesar de que existe en cierta medida la protección heteróloga entre serovariedades del mismo serogrupo (Martins y Lilenbaum, 2017), la inmunidad que se desencadena a partir de la vacunación es específico de serovariedad, y en el caso del ganado bovino vacunado con bacterinas pentavalentes demostró ser vulnerable a la infección con la serovariedad Hardjo a pesar de la presencia de títulos elevados de anticuerpos anti-LPS. Es decir, no lograron prevenir el aborto, la muerte fetal y la transmisión vertical de la infección cuando las vacas vacunadas fueron desafiadas con *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjobovis), durante la gestación, y las tasas de infección para el control y el ganado vacunado no fueron diferentes (Bolin, *et al.*, 1989a); concluyendo que la inducción de la respuesta humoral provocada por el LPS contra la leptospirosis no es suficiente en esta especie (Bolin, *et al.*, 1989b; Bolin, *et al.*, 1991). En la búsqueda de vacunas contra la leptospirosis que tengan un amplio espectro, se han desarrollado inmunógenos basados en PME's, que son conservadas entre las diferentes serovariedades patógenas de *Leptospira*, como LipL41, LipL32, OmpL1, LigA y B (Ko, *et al.*, 2009; Haake y Zückert, 2015; Raja y Natarajaseenivasan, 2015). Sin embargo, sus resultados han sido variables. Estudios realizados con las proteínas OmpA Lp4337,

Lp3685 y Lp0222 de *L. interrogans* exhibieron una notable actividad inmunoprotectora, asociada con un aumento en la respuesta de anticuerpos (IgG), la proliferación de linfocitos y la regulación positiva de las citocinas Th1 (IFN- γ) y Th2 (IL-4 e IL-10) (Yan, *et al.*, 2010). La familia de proteínas de leptospiras similares a las inmunoglobulinas, compuesta por las proteínas LigA, LigB y LigC presentes en la membrana externa han sido ampliamente estudiadas como principales candidatas para utilizarse como vacunas (Matsunaga, *et al.*, 2003; Chang, *et al.*, 2007). En un inicio se creía que las proteínas Lig se encontraban en especies patógenas de *Leptospira* (Palaniappan, *et al.*, 2002a) pero un análisis comparativo de 20 genomas confirmó que, por un lado, *ligB* se encuentra en todas las especies patógenas, pero por otro lado *ligA* sólo se identificó en tres de las nueve especies patógenas (*L. alstoni*, *L. kirschneri* y *L. interrogans*), y *ligC* se presentó en cinco especies de las antes denominadas “intermedias” y cinco de nueve especies patógenas; ninguno de los genes *lig* se identificó en los genomas de saprofitos (Fouts, *et al.*, 2016). LigA y LigB han demostrado una amplia gama de protección tras el desafío en hámsteres, en diferentes estudios, dependiendo de la composición de la vacuna y los métodos de desafío. Numerosos grupos de investigación independientes han hecho diferentes propuestas de diferentes composiciones de vacunas basadas en LigA, algunas de estas son: la región C-terminal de LigA (LigAc) (Faisal, *et al.*, 2008; Techawiwattanaboon, *et al.*, 2020), los dominios específicos del gen *LigA* solos y en combinaciones (Evangelista, *et al.*, 2017), quimeras recombinantes (da Cunha, *et al.*, 2019), entre otras. Se ha visto que estas vacunas protegen contra el desafío entre un 60 % a un 100 % de los animales, y confieren en general una inmunidad tanto humoral como mediada por células, presentando un aumento de los títulos de anticuerpos de tipo IgG₁/IgG₂, proliferación de linfocitos con producción de las citocinas Th1 (IL-12, IFN- γ) y Th2 (IL-4, IL-10) (Faisal, *et al.*, 2008). Sin embargo, ninguna logró conferir inmunidad esterilizante del 100%. Vacunas a partir de LigB, han generado niveles de protección entre el 50% a un 100 % en varios estudios y en diferentes composiciones (Felix, *et al.*, 2020). En particular, una vacuna de subunidad, basada en una región conservada de LigB (*ligB* 131–645) en hámster,

confirió una protección significativa entre el 80 % al 100% contra la mortalidad en animales vacunados en siete experimentos independientes y se observó una inmunidad esterilizante entre el 87.5% al 100 % entre los supervivientes vacunados. La vacuna indujo una producción de IgM e IgG entre los animales vacunados, con un perfil mixto de subclases IgG₁/IgG₂. Ninguna otra vacuna a partir de LigB ha conferido inmunidad esterilizante del 100% (Forster, *et al.*, 2013; da Cunha, *et al.*, 2019; Teixeira, *et al.*, 2019). Recientemente, en nuestro grupo de investigación, se utilizó la proteína recombinante rGspDLC para inducir inmunidad en hámsteres contra el desafío con una cepa virulenta de *Leptospira*. GspD es una proteína denominada secretina del sistema de secreción tipo 2 en *Leptospira*, es una proteína funcional presente en bacterias Gram negativas (Naskar, *et al.*, 2021), en *Leptospira* está ubicada en la membrana externa (Cullen, *et al.*, 2002) y es la décima segunda proteína en abundancia en *Leptospira* (Malmström, *et al.*, 2009). Dicha vacuna experimental administrada en dos ocasiones en un lapso de 14 días entre cada aplicación por vía subcutánea (SC), a una dosis de 50 µg con adyuvante incompleto de Freund (AIF), en hámsteres protegió contra la enfermedad hasta en un 75% de los animales inmunizados en ensayos de desafío con la cepa homóloga virulenta. Más aún, al 50% de los animales sobrevivientes les confirió protección incluso contra la infección (inmunidad esterilizante), no pudiendo detectar al microorganismo por cultivo y PCR en los tejidos renal ni hepático (Llanos Salinas, *et al.*, 2020).

Estudios de leptospirosis experimental en bovinos

La utilización de los modelos experimentales *in vivo* para ampliar el conocimiento que tenemos sobre la Leptospirosis, nos ha proporcionado información relevante y útil, por ejemplo, en el desarrollo de vacunas y en particular en bovinos. Diversos estudios han probado bacterinas en diferentes combinaciones en bovinos realizando desafíos con leptospirosis virulentas, demostrando en todos los casos que la persistencia de la bacteria en los riñones es un problema que sigue sin resolverse (Cortese, *et al.*, 2014); en otros casos se han empleado bovinos para el estudio de la respuesta inmunológica tras la vacunación e infección (Zuerner, *et al.*, 2011; Wilson-Welder, *et al.*, 2021). Otra

aplicación de la infección experimental de Leptospirosis en bovinos, es para el estudio de la patogénesis, uno de este tipo de estudios demostró que después del parto o aborto existe una excreción vaginal de *Leptospira* hasta por 22 días (Ellis, *et al.*, 1985c). Además de la patogénesis, es importante conocer la respuesta inmunológica que va a presentar el animal después de la infección, como lo es la respuesta de anticuerpos IgM e IgG (Cousins, *et al.*, 1985) o la evaluación de la respuesta inmunitaria de tipo TH1 en animales vacunados y no vacunados tras la infección experimental, y la participación de linfocitos T WC1+ $\gamma\delta$ y CD4 durante la misma (Naiman, *et al.*, 2002). La evaluación de tratamientos para la leptospirosis también se ha probado en animales infectados experimentalmente con resultados variables, algunos de los antibióticos probados son la dihidroestreptomicina (Ellis, *et al.*, 1985a), amoxicilina (Smith, *et al.*, 1997), dihidroestreptomicina-penicilina G, oxitetraciclina, tilmicosina y ceftiofur (Alt, *et al.*, 2001). Las serovariedades principalmente usadas en estos experimentos de infección son Pomona, Tarassovi y Hardjo (subtipos Hardjobovis y Hardjoprajitno). Las dosis infectantes por lo general van de 10^5 - 10^9 leptospiras /ml de inóculo, siendo más frecuente la dosis de 10^6 leptospiras por mililitro; esta dosis se aplica de 3 a 4 veces en días consecutivos. Las rutas de infección pueden ser por transmisión natural (convivencia con otros animales infectados) (Mackintosh, *et al.*, 1980; Allen, *et al.*, 1982), por vía intramuscular o intravaginal (Cousins, *et al.*, 1985; Ellis, *et al.*, 1985a), por laparotomía aplicando el inóculo en el centro de un placentoma exteriorizado del cuerno uterino gestante del animal (Ellis, *et al.*, 1985c), por instilación conjuntival (Bolin, *et al.*, 1989a; Rinehart, *et al.*, 2012; Wilson-Welder, *et al.*, 2021) o intraperitoneal (Bolin y Alt, 2001). El estudio de la leptospirosis bovina directamente, en el animal infectado es un método que nos sirve de base para comprender las estrategias para el control de la enfermedad.

2. JUSTIFICACIÓN

La vacunación es considerada una importante medida de prevención de la leptospirosis bovina. Sin embargo, ha existido controversia sobre el grado de protección conferido por las vacunas en esta especie animal (Ellis, 2015). En México, hasta donde entendemos, no se ha evaluado la inmunogenicidad de biológicos contra la leptospirosis bovina en la especie blanco, los bovinos. Para poder evaluar de manera contundente las vacunas verdaderamente útiles para la prevención de la leptospirosis bovina, se requiere previamente de un modelo de infección en la especie animal para la cual son desarrolladas dichas vacunas. Es por eso que se propone establecer un modelo de infección en bovinos utilizando tres aislados de *Leptospira* con diferente grado de virulencia para hámsteres. En el Grupo de Investigación en *Leptospira* y leptospirosis (GrILLeP), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), se ha estudiado la secretina GspD del T2S, de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola, cepa LOCaS46. Rodríguez-Reyes observó que GspD está presente y conservada entre las serovariedades patógenas de *Leptospira* con una identidad del 92% y una similitud del 96% (Rodríguez-Reyes, 2007) y Mena-Bañuelos encontró una identidad del 59% entre serovariedades patógenas y no patógenas (Mena-Bañuelos, 2006). Mediante inmunohistoquímica se pudo comprobar que esta secretina es expresada durante la infección y en ensayos de ELISA se mostró que induce la producción de anticuerpos IgG en ensayos de infección experimental en hámsteres (Alcaraz-Sosa, 2008). Como se ha mencionado con anterioridad, la proteína recombinante rGspDLC utilizada como vacuna en hámsteres, indujo la protección contra el desafío con una cepa virulenta de *Leptospira interrogans* (Llanos Salinas, *et al.*, 2020). Se busca en un futuro probar la inmunogenicidad de esa vacuna recombinante, así como abrir la posibilidad de probar otros inmunógenos e incluso antimicrobianos específicos contra la leptospirosis en bovinos para demostrar su eficacia en esta especie animal, para lo cual es necesario contar con un modelo de infección que sirva como control al momento del desafío.

3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general

Describir las lesiones y afecciones clínico-patológicas que ocasiona la leptospirosis en una infección experimental en becerros con cepas virulentas de *Leptospira* autóctonas, para establecer un modelo de infección experimental.

Objetivos específicos

- Inocular becerros con las tres diferentes cepas de *Leptospira*, LOCaS46 (*L. interrogans* Sv Canicola), LOVe30 (*L. interrogans* serovariedad Icterohaemorrhagiae) y MOCA45 (*L. santarosai* Sv Tarassovi).
- Evaluar el estado clínico de los becerros infectados midiendo su respuesta serológica, su funcionamiento renal, su funcionamiento hepático, y sus constantes fisiológicas.
- Constatar la eficacia de los ensayos de infección mediante el reaislamiento de leptospiras y la detección de ADN de *Leptospira* por PCRa, a partir de tejidos renal y hepático, así como de muestras de orina obtenidas en la necropsia de los animales inoculados.

4. HIPÓTESIS

Posterior a la inoculación experimental, leptospiras virulentas de las serovariedades Canicola, Icterohaemorrhagiae y Tarassovi serán capaces de establecer una infección en becerros, mostrando alteraciones clínicas y patológicas en los bovinos inoculados.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Aprobación del proyecto

El Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales (SICUAE) de la FMVZ de la UNAM aprobó este proyecto con el número de protocolo: SICUAE.MC-2019/3-8.

Lugar y tiempo del estudio

El estudio se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA), de la FMVZ-UNAM (20.611572543127814, -99.91443513808326), en el municipio de Tequisquiapan, Querétaro, del 29 de octubre del 2018 al 07 de febrero del 2019. Durante ese período se tuvo una precipitación pluvial estimada tomando en cuenta los datos proporcionados por CONAGUA de comunidades aledañas como “El Marqués (20.62, -100.23), Constitución (20.418611, -100.080278) y San Ildefonso (20.198611, -99.9625)” con un promedio de 13.52 mm/nm (CONAGUA, 2018-2019) y una temperatura ambiental promedio máxima de 24 °C y mínima de 7.5 °C (Weather-Spark, 2018-2019).

Animales de experimentación

Los nueve animales seleccionados fueron becerros sin distinción de sexo, de dos meses de edad, de las razas Holstein, Jersey y una cruce de Jersey. Como criterios de inclusión se consideraron:

1. Que fueran negativos a la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* en la prueba de AM, contra las serovariedades Autumnalis, Ballum, Canicola, Copenhageni, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Mini, Pomona, Pyrogenes, Sejroe y Tarassovi.
2. Que tuvieran dos meses de edad.
3. Que no tuvieran alguna enfermedad clínicamente detectable.

Se utilizaron dos individuos para los ensayos de infección experimental y un becerro más como testigo por cada una de las tres cepas, para un total de 9 becerros. Los grupos experimentales y el grupo testigo se mantuvieron en corraletas independientes entre sí. Los becerros seleccionados se mantuvieron en corraletas de segregación por grupo durante todo el estudio, dándoles un periodo de adaptación previo de 14 días, bajo una dieta para becerros de su edad consistente en alimento peleteado preiniciador (17% de proteína cruda y 5.5 % de fibra) y alfalfa achicalada, con disposición de bebederos con agua limpia *ad libitum*. Paralelamente, se utilizaron 6 hámsteres para reactivar y demostrar la virulencia de las cepas utilizadas en el experimento.

Cepas de *Leptospira*

Se probaron 3 aislados autóctonos de las serovariedades Canicola, Icterohaemorrhagiae y Tarassovi. La cepa denominada LOCaS46 pertenece a la serovariedad Canicola de *L. interrogans* fue aislada del tejido renal de un perro portador de la alcaldía Gustavo A. Madero de la CDMX en 2006 y tiene alta virulencia con una DL50= 4 para el hámster (Castillo-Sánchez, 2008). La cepa denominada cepa LOVe30 pertenece a la serovariedad Icterohaemorrhagiae de *L. interrogans*, fue aislada del riñón de una rata capturada en la alcaldía Coyoacán de la CDMX en 2007 y tiene una virulencia media con una DL50=40 para el hámster (Montes de Oca-Basilio, datos no publicados). Finalmente, la cepa denominada cepa MOCA45 pertenece a la serovariedad Tarassovi de *L. santarosai*, fue aislada del riñón de un bovino destinado al abasto y matado en un rastro de Villahermosa, Tabasco en 2009, y es una cepa de baja virulencia para hámsteres (DL50 desconocida, pero >10,000); esta cepa es capaz de infectar hámsteres inoculados por vía intraperitoneal pero que no muestra letalidad en ellos. Las tres cepas fueron previamente caracterizadas mediante la técnica de MLST (por sus siglas en inglés de: Multiple Locus Sequencing Typing) (Carmona-Gasca, *et al.*, 2011) y su virulencia ha sido mantenida mediante inoculación seriada cada seis meses en hámsteres, desde su aislamiento hasta el momento de su uso.

Reactivación de la virulencia de las cepas

Con cada cepa se infectaron por vía intraperitoneal (IP) dos hámsteres sirio dorado (*Mesocricetus auratus*), con aproximadamente 10^8 leptospiras en un volumen de 0.5 ml. Todos los animales fueron monitoreados diariamente por la presencia de semiología como deshidratación, pelo rizado, disminución de la actividad o aislamiento. Dos semanas después de la infección, se les aplicó eutanasia a los 6 hámsteres con una sobredosis inhalada de Isoflurano (Sofloran® Vet). Se colectaron asépticamente muestras de hígado y riñón, se maceraron e inocularon en medio líquido EMJH y medio semisólido Fletcher, haciendo diluciones decimales hasta 10^{-4} . Los macerados de los tejidos se observaron en un microscopio de campo oscuro para verificar la presencia de leptospiras. Los cultivos se incubaron a 30 °C hasta su desarrollo, que se obtuvo en

aproximadamente dos semanas de incubación. Estos cultivos se utilizaron como inóculo para infectar a los becerros en estudio, así como a un grupo de 6 hámsteres que sirvió como grupo testigo para verificar la virulencia de las cepas. Este nuevo grupo de hámsteres fue dividido en dos hámsteres por cepa; los inóculos correspondieron con las siguientes dosis: para LOCaS46 1.3×10^6 (hámsteres 1 y 2), para LOVe30 4.4×10^6 (hámsteres 3 y 4) y para MOCA45 2.3×10^6 leptospiras/ml (hámsteres 5 y 6), la vía fue intraperitoneal.

Preparación de los inóculos

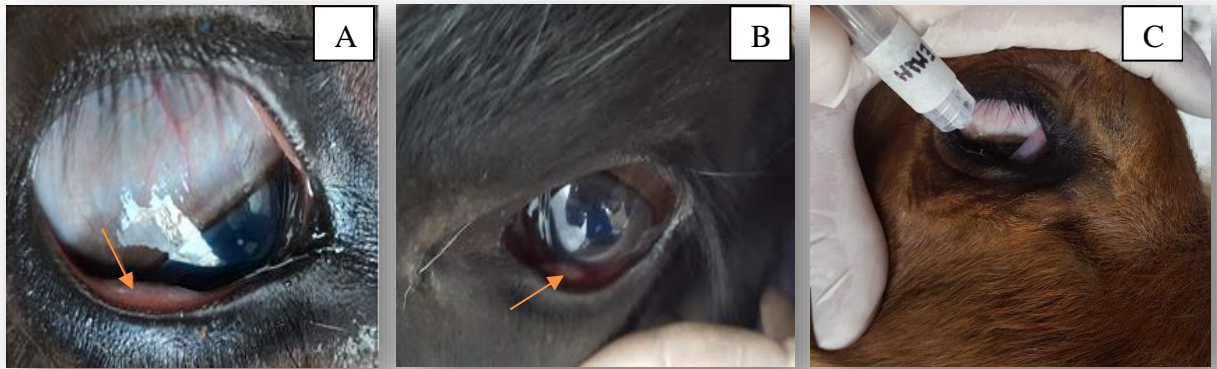
A partir de los cultivos de leptospiras obtenidos en medio semisólido Fletcher de reciente reactivación de su virulencia por inoculación en hámsteres, con una pipeta y de forma estéril se tomó 1 ml del anillo de Dinger y se colocó en un tubo también estéril con 1 ml de medio líquido EMJH. A partir de este subcultivo se realizaron diluciones decimales con más medio EMJH estéril en otros tubos y de ahí se hizo una cuenta de leptospiras de cada dilución en una cámara de Petroff Hausser (Hausser Scientific), bajo microscopio de campo oscuro a 800 aumentos, repitiendo tres veces la cuenta. Se ajustaron los inóculos de cada cepa a cuentas alrededor del logaritmo 10^6 (Cuadro 3), y se mantuvieron en jeringas de 1 ml hasta el momento de la inoculación (aproximadamente 20 minutos).

Infección experimental

Se inocularon dos becerros por cada grupo experimental (Grupo1: LOCaS46, Grupo 2: LOVe30 y Grupo 3: MOCA45); a un becerro con 0.1 ml por vía subconjuntival con jeringa desechable de 1 ml y aguja de calibre 25 G X 5/8 in y al segundo becerro por instilación de un volumen de 0.25 ml en el saco conjuntival, aplicando un masaje en el párpado por un minuto. Los becerros control fueron tratados por instilación de 0.25 ml de medio de cultivo EMJH estéril (Figura 1). La infección experimental se aplicó por tres días consecutivos, considerados como días 0, 1 y 2 en el cronograma experimental (Cuadro 3). Las dosis y vías de inoculación se especifican en el Cuadro 4. Durante los ensayos de

infección experimental se utilizó equipo personal de bioseguridad pertinente (guantes, lentes, cubrebocas, overol y botas limpias).

Figura 1. Infección experimental.



A y B. Sitios de aplicación del inóculo mediante inyección de las cepas de *Leptospira* por vía subconjuntival. Se observa un abultamiento en la conjuntiva como resultado confirmatorio de una correcta inoculación (señalado con una flecha). **C.** Inoculación por instilación a control negativo con medio EMJH estéril, un becerro en cada grupo fue infectado también por este método, después de lo cual se cerró el párpado y se aplicó un masaje manualmente durante un minuto.

Se utilizó cloruro de benzalconio al 0.5% como desinfectante. El material utilizado fue desechado asépticamente y trasladado al laboratorio para su esterilización previa al desecho por incineración.

Colección de muestras

Se colectaron muestras de sangre los días 0, 7, 14 y 28 del cronograma experimental (Cuadro 3), por punción de la vena yugular, mediante sistema Vacutainer® y se depositó en un tubo sin anticoagulante para la prueba de AM y para determinar perfiles bioquímicos sanguíneos (bioquímica sanguínea, BQ), y otro tubo con Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante para realizar el hemograma (HG). Se colectaron muestras de orina obtenida por micción, por medio de estimulación manual de la zona perineal y/o vulvar (Kolb y Gürtler, 1974), para pruebas de

urianálisis (UA), observación en microscopio de campo oscuro (CO) y PCR anidada (PCRa) en los días 0, 7, 14 y 28 y del cronograma experimental (Cuadro 3).

Cuadro 3. Cronograma experimental aplicado a los becerros.

| Tratamiento | Días de aplicación | | | | | | |
|------------------------------------|--------------------|---|---|---|---|----|----|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 7 | 14 | 28 |
| Infeción | X | X | X | | | | |
| Constantes Fisiológicas | X | X | X | X | X | X | X |
| Prueba de AM | X | | | | X | X | X |
| Hemograma | X | | | | X | X | X |
| Bioquímica sanguínea | X | | | | X | X | X |
| Urianálisis | X | | | | X | X | X |
| PCRa de orina y órganos* | X | | | | X | X | X |
| PCRa de orina y órganos* | | | | | | | X |
| Microscopía de CO en orina | X | X | | | X | X | X |
| Cultivo de orina y órganos* | | | | | | | X |

*Hígado y riñón (día 28).

Para aislamiento a partir de la muestra de orina, se concentró únicamente en el día 28 del cronograma experimental (Cuadro 3). Para la prueba PCRa de orina y el aislamiento, se concentró 20 veces la muestra, a partir de un volumen de 10 ml, por centrifugación a 4800 RCF (centrífuga: Centurion Scientific limited - ProResearch K1015R) en un filtro (Amicon Ultra-4, Merck Millipore®), obteniendo un volumen final de 500 µl. Para intentar el aislamiento a partir de orina concentrada, ésta se filtró por una membrana de 0.22 µm (MF-Membrane Filters, Milipore®) y se sembraron 2 gotas en medio semisólido Fletcher. Para observación en CO se colocó una gota de aproximadamente 50 µl de orina en un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos para su posterior visualización en microscopio de CO.

Cuadro 4. Dosis de los inóculos aplicados a becerros de los tres grupos experimentales

| | G1 | G2 | G3 |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Cepa | LOCaS46 (VA) | LOVe30 (VM) | MOCA45 (VB) |
| Sv | Canicola | Icterohaemorrhagiae | Tarassovi |
| Especie | <i>L. interrogans</i> | <i>L. interrogans</i> | <i>L. santarosai</i> |
| Vía Sco (vol.) | 1.04x10 ⁶ (200 µl) | 5.0x10 ⁵ (200 µl) | 3.0x10 ⁵ (200 µl) |
| ID | B1 | B2 | BC3 |
| Vía Inst (vol.) | 2.5 x 10 ⁵ (250 µl) | 7.7 x 10 ⁵ (250 µl) | 4.7x10 ⁵ (250 µl) |
| ID | B4 | B5 | BC6 |
| Vía Inst (vol.) | EMJH (250 µl) | EMJH (250 µl) | EMJH (250 µl) |
| ID | B7 | B8 | BC9 |

G1: Grupo1; **G2:** Grupo 2; **G3:** Grupo 3; **VA:** Virulencia alta; **VM:** Virulencia media; **VB:** Virulencia baja; **ID:** Identificación; **B1:** Becerro 1, **B2:** Becerro 2, **BC3:** Becerro control 3, **B4:** Becerro 4, **B5:** Becerro 5, **BC6:** Becerro control 6, **B7:** Becerro control 7, **B8:** Becerro 8; **BC9:** Becerro control 9; **Sco:** Vía subconjuntival; **Inst:** Vía Instilación; **Vol.:** Volumen del inóculo; **EMJH:** Medio de cultivo EMJH estéril.

Las pruebas de urianálisis y hemograma se realizaron en el laboratorio de Patología Clínica de la USEDICO (Unidad de Servicios de Diagnóstico y Constatación) del CEIEPAA y las pruebas de bioquímica sanguínea se procesaron en el laboratorio de Diagnóstico Veterinario Alhambra S.A. de C.V. ubicado en la alcaldía Miguel Hidalgo, en la CDMX.

Eutanasia de los animales de experimentación y colección de muestras post-mortem

La aplicación de eutanasia en los becerros se realizó al día 28 post-infección en la sala de necropsias de la USEDICO, cumpliendo con lo establecido en la NORMA Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres (Haghenbeck, *et al.*, 2014). Durante la necropsia, se colectaron muestras de riñón e hígado para la detección de *Leptospira* mediante la realización de

una PCRa y aislamiento en medios Fletcher y EMJH. Tanto el hígado como el riñón fueron extraídos de manera aséptica y rápida y se colocaron en una solución de cloruro de benzalconio al 0.05% durante 5 a 10 minutos. Posteriormente se secaron con toallas de papel estériles, al riñón se le retiró la cápsula y se cortó longitudinalmente; al hígado se le cortó un cuadrado de aproximadamente 10 cm por cada lado y 2 cm de profundidad y se retiró. El tejido del parénquima expuesto fue colectado con un raspador metálico estéril, obteniendo un macerado del cual se inocularon aproximadamente 25 mg en tubos con medio Fletcher y EMJH. Finalmente, se hicieron diluciones decimales hasta 10^{-4} las cuales se incubaron a 30 °C hasta por 50 semanas. El macerado fue conservado a -20 °C hasta su uso para la PCRa.

Estandarización de la prueba PCRa

Para la prueba de PCR, con la finalidad de aumentar la sensibilidad y especificidad, se optó por realizar la variante de la PCR anidada (PCRa). En la PCRa se utilizan dos pares de iniciadores sobre la misma región de ADN por amplificar en dos ciclos de amplificación independientes y subsecuentes. Un par de iniciadores externos son utilizados en una primera reacción que amplifican un fragmento de ADN específico y posteriormente, se utiliza ese producto de PCR para correr una segunda PCR utilizando un segundo par de iniciadores internos sobre la misma secuencia. El resultado es una mayor sensibilidad y especificidad de detección sin necesidad de un aparato de PCR de tiempo real (Green y Sambrook, 2019). En este trabajo, se utilizaron iniciadores para dos genes de *Leptospira*, el gen *secY* que codifica para la Pre-proteína SecY, una translocasa transmembranal de la vía secretora bacteriana del sistema de secreción tipo 2 (T2S), y el gen *gspD* que codifica para la secretina del sistema de secreción tipo 2 (T2S) de *Leptospira* (Cuadro 5). Los iniciadores externos para *secY* amplifican un fragmento 549 pb en las tres cepas, mientras que los iniciadores internos para LOCaS46 y LOVe30 amplifican un fragmento de 402 pb y para MOCA45 de 412 pb. Por otro lado, los iniciadores externos de *gspD* amplifican un fragmento de 1,254 pb y los iniciadores internos un fragmento de 490 pb en las tres cepas. Los iniciadores fueron diseñados a partir de las secuencias del gen *secY* de *L. interrogans*

| Cuadro 5. Iniciadores empleados para PCRa. | | | |
|---|--|---|---|
| <i>secY</i> | Amplificado externo: (549 pb) | Adelantado: ATG CCG ATC ATT TTT GCT TC Reverso: CCG TCC CTT AAT TTT AGA CTT CTT C | |
| | Amplificado interno: (1: 402pb) (2: 412pb) | Adelantado 1: AAG AAT GGG CTG GAT GGG (LOCaS46 y LOVE30) Adelantado 2 TCC AGC AGT CAA CAG TGG (MOCA45) Reverso: AAG TCT CGA GTG CAA CCC | |
| | <i>gspD</i> | Amplificado externo: (1,254 pb) | Adelantado: GAT TAT AGA ACG ATC ACT CAG Reverso: AAC AGT CAT CTT ATC CGC |
| | | Amplificado interno: (490 pb) | Adelantado: TTA CTT CTC CTA ATA CGG Reverso: TTA TAT CTC CAA TCG ATC CC |
| pb: longitud del amplificado en pares de bases | | | |

serovariedad Canicola (GenBank: EU357961) (Cuadro 13), de *Icterohaemorrhagiae* (GenBank: EU357997) (Cuadro 14) y de *L. santarosai* (GenBank: MH231557) (Cuadro 15). En el caso del gen *gspD* se utilizó la secuencia de *L. interrogans* serovariedad Canicola (GenBank: MT743253.1 y GenBank: ASV09079.1) (Cuadro 12) y para la serovariedad *Icterohaemorrhagiae* y *Tarassovi* (*L. santarosai*) se utilizó un trabajo previo de secuenciación por MLST que realizó el Dr. Carlos Carmona Gasca (Carmona-Gasca, 2011). Dichos iniciadores fueron sintetizados en el laboratorio de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT) y probados con anterioridad por el grupo de investigación GrILLeP (Flores-Popoca, 2006; Carmona-Gasca, 2011), a excepción de los iniciadores internos de *secY* que fueron diseñados específicamente para este trabajo. La PCRa se realizó conforme las recomendaciones de Carmona Gasca, con algunas modificaciones (Carmona-Gasca, 2011). Inicialmente se probaron los iniciadores a partir de extracciones de ADN de

cultivos de leptospiras; la concentración de ADN se determinó por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260/280 nm utilizando el instrumento NanoDrop® 1000 (Thermo Scientific®). Se extrajo el ADN del macerado de riñón e hígado (25 mg) y de 200 µl de la orina concentrada utilizando el paquete comercial para extracción de tejidos y líquidos DNeasy® Blood & Tissue Kit (Quiagen®), siguiendo las instrucciones y recomendaciones del fabricante. El ensayo de PCRa se llevó a cabo en microtubos de 200 µl en un volumen final de 30 µl utilizando 15.4 µl de agua libre de DNAsas y RNAsas (Ultra Pure® Distilled Water-Invitrogen), 10 µl de reactivo comercial MyTaq® Mix (Bioline®), 0.3 µl de cada iniciador que se encontraba a una concentración de 10 µM, y de ADN extraído se utilizaron 4 µl a una concentración promedio de 10 ng de ADN por µl. El ADN se cuantificó con el espectrofotómetro NanoDrop® 1000 (Thermo Scientific®). Como control positivo, se usó ADN extraído a partir de cultivos de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46, *Leptospira interrogans* serovariedad Icterohaemorrhagiae cepa LOVe30 y *Leptospira santarosai* serovariedad Tarassovi cepa MOCA45 y como control negativo agua libre de DNAsas y RNAsas (Ultra Pure® Distilled Water-Invitrogen). Las condiciones de amplificación para la PCRa de ambos genes fueron las siguientes:

| Constantes para el amplificado externo: | Constantes para el amplificado interno: |
|---|---|
| 94°C → 5 min → 1 ciclo | 94°C → 5 min → 1 ciclo |
| 94°C → 30 s | 94°C → 30 s |
| 56°C → 50 s | 60°C → 50 s |
| 72°C → 45 s | 72°C → 45 s |
| 72°C → 7 min → 1 ciclo | 72°C → 7 min → 1 ciclo |
| } 35 ciclos | } 35 ciclos |

La visualización de los productos amplificados en la PCRa fue hecha mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de Etidio (Sigma-Aldrich®) tomando de una solución madre de 1mg/ml el 10% del volumen del gel,

aplicándolo directamente y visualizando el DNA con un transiluminador (Foto/Prep®). Se utilizó el marcador de peso molecular comercial HyperLadder® 1kb (Bioline®).

Análisis histopatológico.

Como se ha mencionado anteriormente, durante la necropsia se obtuvieron muestras de órganos (hígado y riñón), se fijaron en solución tamponada de formaldehído al 10 %, se incluyeron en parafina y se seccionaron a 5 µm de grosor con un microtomo (modelo: RM2245, LEICA®), para posteriormente ser teñidas con Hematoxilina-Eosina (HE) en un aparato Histoquinete (modelo: TP1020, LEICA®) y finalmente ser visualizadas en microscopio (modelo: DM1000, LEICA®).

6. RESULTADOS

Activación de virulencia en hámsteres

Se logró la reactivación de la virulencia de tres cepas seleccionadas al infectar un grupo de hámsteres y obtener el reaislamiento en medio Fletcher a las dos semanas de incubación de los inóculos a partir de hígado y riñón. Para evaluar la virulencia de los cultivos obtenidos, se infectaron otro grupo de 6 hámsteres, los infectados con la cepa LOCaS46 y LOVe30, murieron a los 6 y 8 días respectivamente posteriores a su infección, el día de su muerte presentaron ictericia (Figura 2), aletargamiento, pelo hirsuto y temblores musculares, a la necropsia los pulmones presentaron petequias multifocales en diferentes intensidades, notándose con más la cantidad y de manera grave las hemorragias (petequias) en los pulmones de los hámsteres infectados con LOCaS46, en cantidad moderada los infectados con LOVe30 y sin lesiones los del grupo de MOCA45 (Figura 3). El grupo de hámsteres inoculado con la cepa MOCA45 se les aplicó eutanasia al día 9 postinfección y estos no presentaron semiología, ni lesión observable. En la observación a CO del macerado de hígado y riñón de los hámsteres de los tres grupos se apreciaron un gran número de leptospiras viables, principalmente en riñón. Las muestras de hígado y riñón fueron sembradas en medio EMJH y Fletcher

Figura 2. Necropsia de hámster infectado con la cepa LOCaS46 de *L. interrogans* Sv Canicola.

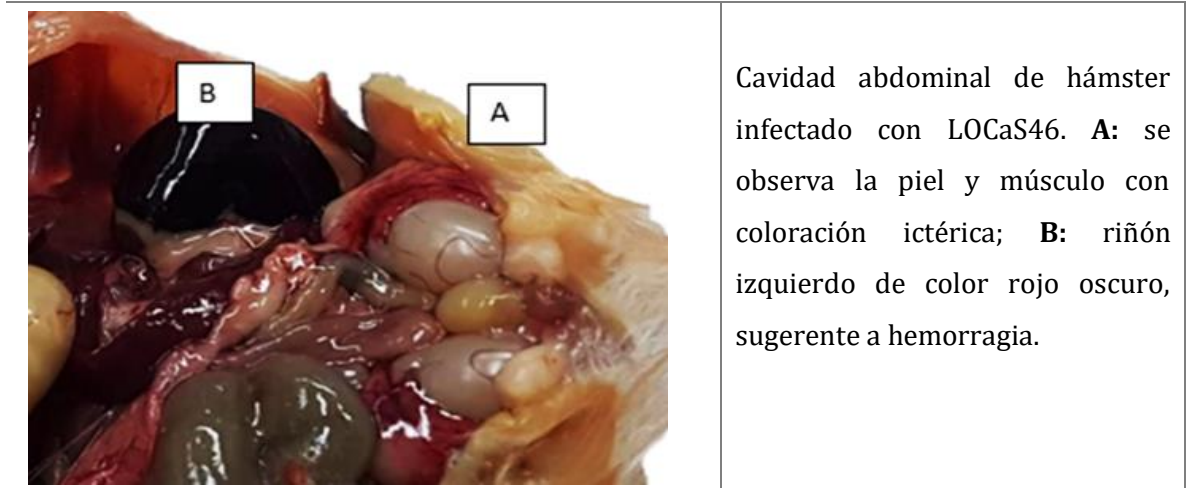


Figura 3. Lesiones pulmonares macroscópicas de hámsteres.



A: Pulmones del hámster infectado con la cepa LOCaS46 de *L. interrogans* Sv Canicola en el que se observan múltiples petequias multifocales. **B:** Pulmones del hámster infectado con la cepa LOVe30 de *L. interrogans* Sv Icterohaemorrhagiae con petequias en cantidad moderada. **C:** Pulmones del hámster, infectado con la cepa MOCA45 de *L. santarosai* Sv Tarassovi, sin lesiones macroscópicas aparentes.

estéril realizando tres diluciones decimales e incubando a 30 °C, se obtuvieron los aislamientos del agente al mes de incubación. Se confirmó que las cepas LOCaS46 y LOVe30 inoculadas en hámsteres fueron de alta y media virulencia, MOCA45 no fue virulenta, pero sí capaz de infectar a los hámsteres colonizando sus riñones e hígado. Paralelamente, fue corroborada la infección por PCRa amplificando fragmentos de ADN, al dar positivo con los dos pares de iniciadores probados (para el gen de *gspD* y *secY*) a partir del tejido renal y hepático.

Detección de anticuerpos en los hámsteres infectados

En la prueba serológica de AM del suero de los hámsteres infectados con LOCaS46 (hámsteres 1 y 2) fueron negativos. Los hámsteres infectados con LOVe30 tuvieron los siguientes resultados: hámster 3 positivo a Copenhageni 1:200 e Icterohaemorrhagiae 1:100 y hámster 4 positivo a Ballum 1:400, Copenhageni 1:400 e Icterohaemorrhagiae 1:400. Los resultados de los ejemplares infectados con la cepa MOCA45 fueron los siguientes: hámster 5 positivo a Autumnalis 1:200, Copenhageni 1:200, Icterohaemorrhagiae 1:200 y Tarassovi 1:100; mientras que el hámster 6 fue positivo a Ballum 1:400, Canicola 1:200, Copenhageni 1:400, Grippytyphosa 1:100, Icterohaemorrhagiae 1:200, Pomona 1:100 y Tarassovi 1:200 (Cuadro 6).

Cuadro 6. Títulos de anticuerpos en la prueba de AM de sueros de los hámsteres infectados experimentalmente.

| Cepa | ID | AUT | BAL | CAN | COP | GRI | HPJ | ICT | MIN | POM | PYR | SEJ | TAR |
|-------------------------------|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|------------|--------------|
| LoCaS46 | H1 | 1:50 | - | - | 1:50 | - | - | - | - | - | - | - | 1:50 |
| | H2 | 1:50 | - | - | 1:50 | - | - | - | - | - | 1:50 | - | 1:50 |
| LOVe30 | H3 | 1:50 | 1:50 | - | 1:200 | - | - | 1:100 | - | - | - | - | - |
| | H4 | - | 1:400 | 1:50 | 1:400 | 1:50 | - | 1:400 | - | - | - | - | - |
| MOCA45 | H5 | 1:200 | 1:50 | 1:50 | 1:200 | - | - | 1:200 | - | 1:50 | 1:50 | - | 1:100 |
| | H6 | 1:50 | 1:400 | 1:200 | 1:400 | 1:100 | - | 1:200 | - | 1:100 | 1:50 | - | 1:200 |
| Positivos (≥1:100) | | 1 | 2 | 1 | 4 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Título más alto | | 1:200 | 1:400 | 1:200 | 1:400 | 1:100 | - | 1:400 | - | 1:100 | 1:50 | - | 1:200 |

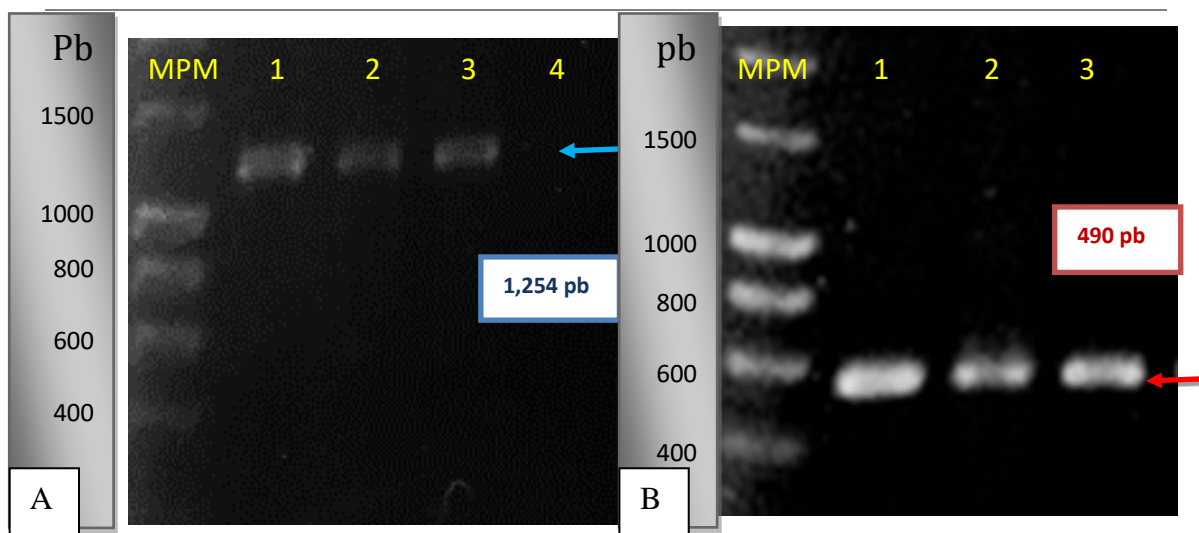
LOCaS46: *L. interrogans* Sv Canicola; LOVe30: *L. interrogans* Sv Icterohaemorrhagiae; MOCA45: *L. santarosai* Sv Tarassovi; *Títulos considerados como positivos ≥1:100.

Svs: Autumnalis (AUT), Ballum (BAL), Canicola (CAN), Copenhageni (COP), Grippotyphosa (GRI), Hardjo (HPJ), Icterohaemorrhagiae (ICT), Mini (MIN), Pomona (POM), Pyrogenes (PYR), Sejroe (SEJ) y Tarassovi (TAR); ID: identificación; **H1-6:** hámster 1-6.

Estandarización de la prueba PCR anidada.

Se estandarizó inicialmente la prueba utilizando ADN de las cepas LOCaS46, LOVe30 y MOCA45 extraído a partir de cultivos de leptospiras para corroborar la funcionalidad de los iniciadores, verificando que amplificaran de manera correcta en el tamaño de pares de bases esperado como se muestra en la Figura 4.

Figura 4. PCRa del gen *gspD* con ADN de las cepas LOCaS46, LOVe30 y MOCA45.



A: PCRa con **iniciadores externos** para *gspD* que amplifican **1, 254 pb**; **B:** PCRa con **iniciadores internos** para *gspD* que amplifican **490 pb**; **MPM:** Marcador de peso molecular HyperLadder® 1kb (Bioline®); **Carril 1:** ADN de cepa LOCaS46; **2:** ADN de cepa LOVe30; **3:** ADN de cepa MOCA45; **4:** control negativo; **pb:** longitud del amplificado en pares de bases.

Paralelamente, se hizo una PCRa con diluciones del ADN de LOCaS46, LOVe30 y MOCA45 de 1/20, 1/50, 1/100, 1/500 hasta 1/1,000 para hacer una estimación de la cantidad mínima de ADN que es posible cuantificar mediante la PCRa. En este ensayo fue posible detectar una banda de amplificación aún en la dilución 1/1,000 (Figura 5).

Figura 5. PCRa. Diluciones de ADN con *gspD*.



LOCaS46

LOVe30

MOCA45

MPM: Marcador de peso molecular HyperLadder® 1kb (Bioline®); **pb:** longitud del amplificado en pares de bases.

En el Cuadro 7 se ejemplifican las cantidades aproximadas en nanogramos por microlitro por dilución de ADN que detectó la prueba PCRa.

Cuadro 7. Cantidad de ADN por dilución en las tres cepas: LOCaS46, LOVe30 y MOCA45.

| Dilución | Cantidad de ADN de LOCaS46 (ng/μl) | Cantidad de ADN de LOVe30 (ng/μl) | Cantidad de ADN de MOCA45 (ng/μl) |
|----------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1/10* | 18 | 0.2 | 15 |
| 1/20 | 9 | 0.1 | 7.5 |
| 1/50 | 3.6 | 0.04 | 3 |
| 1/100 | 1.8 | 0.02 | 1.5 |
| 1/500 | 0.36 | 0.004 | 0.3 |
| 1/1000 | 0.18 | 0.002 | 0.15 |

*La dilución 1/10 fue la única cuantificada por el equipo NanoDrop, el resto se estimaron por correspondencia de la dilución.

Infección experimental en becerros

Los animales de los tres grupos de experimentación no mostraron alteraciones en sus constantes fisiológicas (frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria y temperatura); los animales fueron evaluados de manera individual diariamente, durante los 28 días del estudio (Cuadro 3). Sin embargo, presentaron diarreas periódicas, probablemente como resultado del hacinamiento, por lo que desarrollaron una deshidratación ligera (hemoconcentración).

Detección de anticuerpos en la prueba de Aglutinación Microscópica (AM).

- Grupo 1, cepa LOCas46 de *L. interrogans* Sv Canicola: En la prueba de AM tanto los becerros infectados, como el becerro control, resultaron negativos durante todo el estudio, considerando como positivos con el punto de corte a partir de la dilución 1:100. Sin embargo, se observó un ligero aumento hasta un título de 1:50 contra Svs distintas a Canicola en uno de los becerros, entre las que incluía a las Svs Copenhageni, Hardjoprajitno e Icterohaemorrhagiae al día siete y Autumnalis, Ballum y Grippytyphosa al día 28; los títulos no alcanzaron el punto de corte para considerarse positivos y los resultados no fueron consistentes (Cuadro 8).
- Grupo 2: El grupo de becerros infectados con la cepa LOVe30 de *L. interrogans* Sv Icterohaemorrhagiae resultaron positivos a la presencia de anticuerpos en la prueba de AM mostrando títulos contra las Svs Autumnalis, Copenhageni e Icterohaemorrhagiae a partir del día 14; y contra Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona y Pyrogenes en el día 28 al final del experimento (Cuadro 9).
- Grupo 3: El grupo de becerros infectados con la cepa MOCA45 de *L. santarosai* Sv Tarassovi resultaron positivos a la presencia de anticuerpos en la prueba de AM a partir del día 14 con títulos de 1:200 contra la Sv Tarassovi, y al día 28 presentaron antigenicidad cruzada contra las Svs Copenhageni, Autumnalis y Canicola (Cuadro 10).

Cuadro 8. Resultados de AM de sueros de becerros del G1 LOCaS46.

| | ID | AUT | BAL | CAN | COP | GRI | HPJ | ICT | MIN | POM | PYR | SEJ | TAR |
|----------------------------|-----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|-------------|-------------|----------|-------------|
| Pre inoculación | B1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | B2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | BC3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Día 0 | B1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | B2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | BC3 | - | - | 1:50 | - | - | - | 1:50 | - | - | - | - | 1:50 |
| Día 7 | B1 | - | - | - | - | - | - | 1:50 | - | - | - | - | - |
| | B2 | - | - | - | 1:50 | - | 1:50 | - | - | - | - | - | - |
| | BC3 | - | - | 1:50 | 1:50 | - | - | - | - | 1:50 | - | - | - |
| Día 14 | B1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | B2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | BC3 | - | - | 1:50 | 1:50 | 1:50 | - | 1:50 | - | 1:50 | - | - | - |
| Día 28 | B1 | 1:50 | 1:50 | - | - | 1:50 | - | - | - | - | - | - | - |
| | B2 | 1:50 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | BC3 | 1:50 | - | - | - | - | 1:50 | 1:50 | - | - | - | - | 1:50 |
| Positivos (≥1:100) | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Título más alto | | 1:50 | 1:50 | 1:50 | 1:50 | 1:50 | 1:50 | 1:50 | - | 1:50 | 1:50 | - | 1:50 |

B1 y B2: Becerros inoculados con la cepa LOCAs45 de *L. interrogans* Sv Canicola; **BC3:** Becerro control, inoculado con medio EMJH.; **Svs:** Autumnalis (AUT), Ballum (BAL), Canicola (CAN), Copenhageni (COP), Grippotyphosa (GRI), Hardjo (HPJ), Icterohaemorrhagiae (ICT), Mini (MIN), Pomona (POM), Pyrogenes (PYR), Sejroe (SEJ) y Tarassovi (TAR). *Títulos considerados como positivos ≥1:100.

Cuadro 9. Resultados de AM de sueros de becerros del grupo G2 LOVE30.

| | ID | AUT | BAL | CAN | COP | GRI | HPJ | ICT | MIN | POM | PYR | SEJ | TAR |
|----------------------------|-----|--------------|------|--------------|--------------|------|--------------|--------------|-----|--------------|--------------|------|-----|
| Pre inoculación | B4 | - | - | - | 1:50 | - | - | 1:50 | - | - | - | - | - |
| | B5 | - | - | - | - | - | 1:50 | - | - | - | - | - | - |
| | BC6 | 1:50 | - | 1:50 | 1:50 | - | 1:100 | - | - | - | - | - | - |
| Día 0 | B4 | - | 1:50 | - | - | - | 1:50 | - | - | - | 1:50 | - | - |
| | B5 | 1:50 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | BC6 | 1:50 | - | 1:50 | - | - | 1:50 | - | - | - | 1:50 | - | - |
| Día 7 | B4 | - | - | - | - | 1:50 | - | - | - | - | - | - | - |
| | B5 | - | - | 1:50 | 1:50 | - | 1:50 | - | - | - | - | 1:50 | - |
| | BC6 | - | - | 1:50 | - | 1:50 | 1:50 | - | - | - | - | - | - |
| Día 14 | B4 | 1:50 | - | - | 1:50 | - | - | 1:400 | - | - | - | - | - |
| | B5 | 1:100 | - | - | 1:100 | 1:50 | - | 1:100 | - | - | - | - | - |
| | BC6 | - | - | - | 1:50 | - | - | 1:50 | - | 1:50 | - | 1:50 | - |
| Día 28 | B4 | - | 1:50 | 1:50 | 1:50 | - | 1:50 | 1:400 | - | 1:50 | 1:50 | - | - |
| | B5 | 1:50 | 1:50 | 1:100 | 1:50 | 1:50 | - | 1:200 | - | 1:200 | 1:400 | - | - |
| | BC6 | - | - | - | 1:50 | - | 1:50 | - | - | - | 1:50 | - | - |
| Positivos (≥1:100) | | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 4 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Título más alto | | 1:100 | 1:50 | 1:100 | 1:100 | 1:50 | 1:100 | 1:400 | - | 1:200 | 1:400 | 1:50 | - |

B4 y B5: Becerros inoculados con la cepa LOVE30 de *L. interrogans* Sv Icterohaemorrhagiae; **BC6:** Becerro control: inoculado con medio EMJH. Sv: Autumnalis (AUT), Ballum (BAL), Canicola (CAN), Copenhageni (COP), Grippotyphosa (GRI), Hardjo (HPJ), Icterohaemorrhagiae (ICT), Mini (MIN), Pomona (POM), Pyrogenes (PYR), Sejroe (SEJ) y Tarassovi (TAR); *Títulos considerados como positivos ≥1:100.

Cuadro 10. Resultados de AM de sueros de becerros del grupo 3 MOCA45.

| | ID | AUT | BAL | CAN | COP | GRI | HPJ | ICT | MIN | POM | PYR | SEJ | TAR |
|----------------------------|-----|--------------|------|--------------|--------------|------|--------------|------|------|--------------|------|------|--------------|
| Pre inoculación | B7 | - | - | - | 1:50 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | B8 | - | - | 1:50 | 1:50 | - | - | 1:50 | - | - | - | - | - |
| | BC9 | 1:50 | 1:50 | 1:50 | 1:50 | - | 1:50 | 1:50 | - | - | - | - | - |
| Día 0 | B7 | - | - | 1:50 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | B8 | 1:50 | 1:50 | 1:50 | - | - | 1:50 | - | - | - | - | - | - |
| | BC9 | 1:50 | - | 1:50 | - | - | 1:100 | - | - | - | - | - | - |
| Día 7 | B7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | B8 | - | - | - | - | - | - | - | 1:50 | - | - | - | - |
| | BC9 | - | - | - | 1:50 | - | 1:100 | - | 1:50 | 1:200 | - | - | - |
| Día 14 | B7 | - | 1:50 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1:200 |
| | B8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | BC9 | - | - | - | 1:50 | - | 1:100 | - | 1:50 | 1:100 | - | - | - |
| Día 28 | B7 | - | - | 1:100 | 1:100 | - | - | - | - | - | 1:50 | - | 1:50 |
| | B8 | 1:100 | - | 1:100 | 1:50 | 1:50 | - | - | - | - | 1:50 | 1:50 | - |
| | BC9 | - | - | - | 1:50 | - | 1:50 | - | - | 1:100 | 1:50 | 1:50 | - |
| Positivos | | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 1 |
| Título más alto | | 1:100 | 1:50 | 1:100 | 1:100 | 1:50 | 1:100 | 1:50 | 1:50 | 1:200 | 1:50 | 1:50 | 1:200 |

B7 y B8: Becerros inoculados con la cepa MOCA45 de *L. santarosai* Sv Tarassovi; **BC9:** Becerro control: inoculado con medio EMJH. **Sv:** Autumnalis (AUT), Ballum (BAL), Canicola (CAN), Copenhageni (COP), Grippotyphosa (GRI), Hardjo (HPJ), Icterohaemorrhagiae (ICT), Mini (MIN), Pomona (POM), Pyrogenes (PYR), Sejroe (SEJ) y Tarassovi (TAR); *Títulos considerados como positivos $\geq 1:100$.

Hemograma

- Grupo1 LOCaS46: Los tres becerros de este grupo presentaron eritrocitosis relativa ligera por deshidratación a lo largo del estudio, en diferentes periodos, sin mayores alteraciones. Al día 28 los becerros B1 y B2 mostraron en el HG un “Leucograma por estrés” (leucocitosis, linfopenia, monocitosis y neutrófilos con desviación a la izquierda).
- Grupo2 LOVe30: En el día 7 el B4 presentó en el HG leucocitosis y linfocitosis; para el día 14 mostró inflamación ligera o excitación (leucocitosis y neutrofilia); y en el día 28 sus resultados no mostraron alteraciones. El B5 mostró una inflamación aguda por una neutrofilia que se presentó el día 28. Por último, para este grupo el BC6 en el día 14 se reportó una respuesta antigénica inespecífica (linfocitosis y leucocitosis) y en el día 28 un aumento en el conteo de leucocitos y linfocitos y una disminución de neutrófilos.
- Grupo3 MOCA45: Los becerros B7 y B8 durante el estudio en el HG resultaron sin alteraciones, hasta el día 28 presentando una disminución de los neutrófilos y un aumento del conteo de linfocitos. El BC9 se mantuvo sin alteraciones en todo el estudio.

Bioquímica

- Grupo1 LOCaS46: En este grupo el becerro B1 en el día 7 presentó un aumento en la GLDH (Glutamato deshidrogenasa), enzima que persistió hasta el día 28 y al día 14 se le sumó una hiperfosforemia. El becerro B2 tuvo un aumento de la GLDH en el día 14 y para el día 28 una hipercalemia.
- Grupo2 LOVe30: En la BQ el becerro B4 presentó para el día 28 una hiperfosfatemia sin más resultados de relevancia. El becerro B5 y el control tampoco tuvieron resultados de mayor relevancia.
- Grupo3 MOCA45: Al día 14 el becerro B7 y B8 presentaron un aumento en los niveles de urea, y el becerro B8 mostró, además, un incremento de la GLDH que

persistió hasta el día 28. El becerro control BC9 no tuvo alteraciones de relevancia clínica.

Urianálisis

- Grupo1 LOCaS46: Los resultados del UA del becerro B1 en el día 7 nos indicó la presencia de células epiteliales transitorias 1-4/campo a 400X aumentos y para el día 28 se vieron de 2-6/campo a 400X aumentos; en el día 14 tuvo presencia de proteinuria y cristaluria moderadas por estruvita. El becerro B2 presentó eliminación de células transitorias por la orina 2-7/campo a 400X aumentos a partir del día 7 y para el día 28 de 2-8/campo a 400X aumentos; también al día 14 se pudo notar una proteinuria leve que avanzó a moderada para el día 28, además de una cristaluria moderada por estruvita presente en los días 14 y 28, por último, en el día 28 se observaron células epiteliales renales 0-1/ campo 400X. El becerro control BC3 también tuvo presencia de células transitorias en la muestra de orina 0-1/campo a 400X aumentos en el día 7, una cristaluria de ligera a moderada por estruvita y una proteinuria ligera en el día 14.
- Grupo2 LOVe30: en el UA del becerro B4 indicó en el día 7 la presencia de proteinuria grave, bilirrubinuria ligera; para el día 14 se sumó la presencia de células transitorias 0-1/campo en 400X aumentos y de células renales 1-4/campo en 400X aumentos. El becerro 5 desde el día 7 tuvo proteinuria grave y bilirrubinuria ligera; en el día 14 se le sumó una urobilinuria ligera y en el día 28 ya presentaba hemoglobinuria ligera y presencia de células transitorias 0-1/campo en 400X aumentos. El becerro control BC6 presentó desde el día 7 proteinuria moderada que para el día 28 ya era ligera, bilirrubinuria ligera, urobilinuria moderada que para el día 28 disminuyó a ligera, hemoglobinuria ligera, presencia de células escamosas 0-1/campo en 400X aumentos, de células transitorias 0-1/campo en 400X aumentos y cristaluria de estruvita en presencia moderada.
- Grupo3 MOCA45: En el estudio de UA el becerro B7 en el día 7 tuvo proteinuria grave, bilirrubinuria ligera y presencia de detritos celulares, en el día 14 se le sumó

una urobilinuria moderada y para el día 28 presentó hemoglobinuria ligera. El becerro 8 en el día 7 tuvo proteinuria moderada, bilirrubinuria ligera, en el día 14 la proteinuria fue ligera; tuvo urobilinuria ligera, presencia de células transitorias 0-2/campo en 400X aumentos y células renales 1-3/campo 400X. El becerro control tuvo alteraciones como una proteinuria moderada en el día 7, además de bilirrubinuria ligera, los cuales, ya no se manifestaron para el día 28.

Patología e histopatología

- Grupo1 LOCaS46: Los resultados de patología de las necropsias de los becerros del grupo de becerros inoculados con la cepa LOCaS46 de *L. interrogans* Sv Icterohaemorrhagiae indicaron lo siguiente: en el becerro B1 macroscópicamente se observó que el hígado presentaba la cápsula opaca (engrosamiento), puntos blanquecinos, congestión ligera multifocal, hepatomegalia ligera (bordes redondeados) (figura 6); microscópicamente se observó una hepatitis linfocítica periportal ligera con disociación de cordones hepáticos (figura 9) generalizado, con degeneración vacuolar zonalmente extensiva de la serosa moderadas, necrosis, congestión y edema intersticial multifocales ligeros. En los riñones, macroscópicamente se notaba una congestión medular moderada multifocal, con hemorragia moderada zonal; microscópicamente los riñones mostraban nefritis linfocítica, congestión generalizada, necrosis focal, hemorragia zonal y degeneración vacuolar en corteza ligeros.

El becerro B2 presentó en el estudio macroscópico el hígado con bordes redondeados (hepatomegalia), con áreas blancas ligero multizonal; en el estudio microscópico del hígado se observó una disociación de cordones hepáticos (figura 9) generalizada moderada, necrosis multifocal, congestión y edema generalizados ligeros. El riñón visto macroscópicamente tenía áreas de congestión en médula de ligero a moderado multifocal y zonas más claras (degeneración hidrópica) multifocales; en los riñones microscópicamente se observó nefritis intersticial (figura 8) multifocal coalescente, principalmente en zona tubular, con congestión

zonalmente extensiva hacia médula graves, con una hemorragia zonal hacia médula moderada y edema generalizado y necrosis tubular zonal ligeros.

Figura 6. Hígado con bordes redondeados.

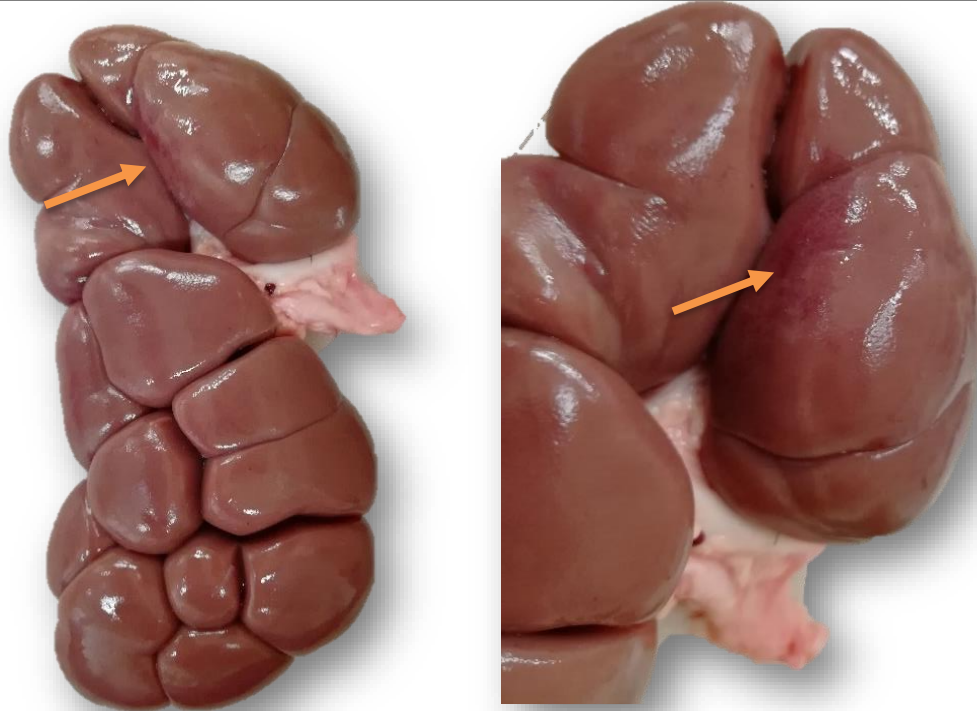


Observación **macroscópica** del hígado del becerro **B1**, infectado con la cepa LOCaS46, donde se aprecian los bordes del órgano redondeados (flecha anaranjada) y con una cápsula opaca (estrella anaranjada).

- Grupo2 LOVe30: Los resultados de patología fueron los siguientes: macroscópicamente el becerro B4 presentó en el hígado zonas blancas multifocales ligeras profundas (necrosis hepática ligera multizonal coalescente); microscópicamente en el mismo becerro B4 se observó una hepatitis linfocítica focal ligera con congestión generalizada moderada, edema y disociación de cordones hepáticos (figura 9) generalizada, necrosis y hemorragias focales ligeras. En riñones macroscópicamente se observaron áreas blancas multifocales, engrosamiento de la cápsula renal multifocal coalescente, una superficie ligeramente granular, entre la corteza y médula se observaron áreas blancas (necrosis multifocal) y congestión medular moderada multizonal; microscópicamente en los riñones se observó una nefritis intersticial focal ligera

(figura 8), con congestión tubular zonalmente extensiva grave y una hemorragia focal ligera.

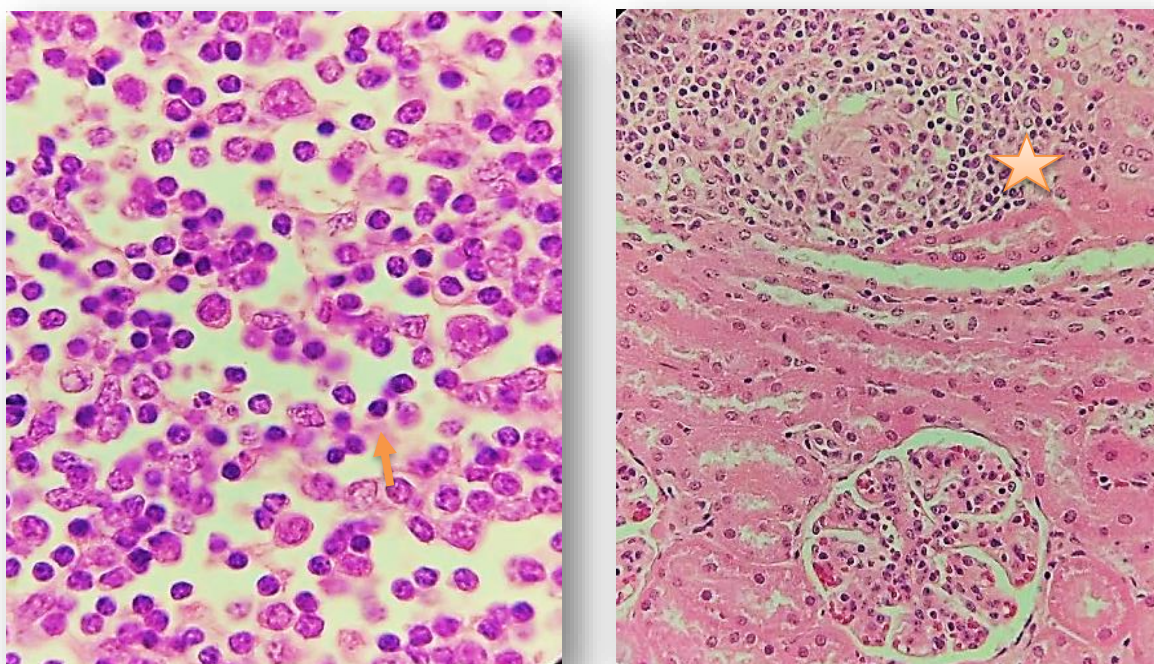
Figura 7. Riñón con hemorragia.



Observación **macroscópica** del riñón del becerro **B5**, infectado con la cepa LOVe30, donde se aprecian zonas rojizas correspondientes a hemorragias (flechas anaranjadas).

El becerro B5 el hígado mostró macroscópicamente bordes redondeados (hepatomegalia moderada), y un color ligeramente rojo oscuro; microscópicamente mostró hepatitis linfoplasmocítica focal moderada con necrosis focal, edema multizonal y disociación de cordones hepáticos (figura 9) zonal ligeros. Los riñones macroscópicamente mostraron un aumento de tamaño, una congestión medular moderada y zonas rojizas sugerentes a hemorragias multifocales (figura 7); microscópicamente se observó que los riñones presentaron necrosis focal, congestión en túbulos y hacia médula generalizada moderada, edema y degeneración vacuolar generalizados ligeros.

Figura 8. Nefritis intersticial.



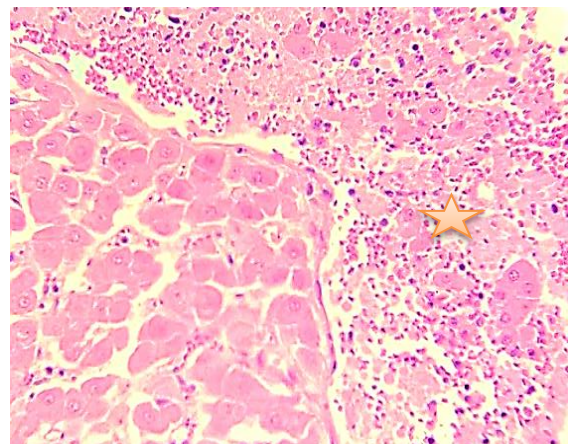
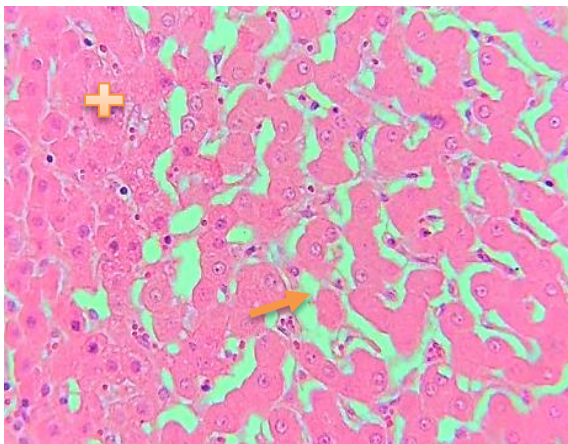
Células inflamatorias en riñón como **linfocitos** (flecha anaranjada)

Nefritis intersticial (estrella anaranjada)

- Grupo3 MOCA45: A la necropsia, macroscópicamente los becerros presentaron el hígado con un color pálido, con zonas blancas coalescentes (sugierentes a necrosis), con áreas de hemorragias de ligeras a moderadas (petequias, equimosis y sufusiones); microscópicamente el becerro B7 en el hígado mostró una disociación de cordones hepáticos (figura 9) generalizada moderada, con edema y congestión generalizados, necrosis focal y hemorragia zonal ligeros. El becerro B8 microscópicamente en hígado presentó hepatitis linfoplasmocítica multifocal al azar ligera con disociación de cordones hepáticos (figura 9) generalizado y congestión multizonal moderados y edema generalizado ligero. Los riñones de los becerros macroscópicamente denotaron depresiones (posibles zonas de necrosis y reparación), petequias con distribución al azar, congestión ligera a moderada en

médula, ligero aspecto granular, puntos blancos multifocales, superficie pálida y con congestión, corteza del riñón engrosada y congestionada; microscópicamente en el becerro B7 se observó congestión extensiva grave a nivel tubular, dirigiéndose hacia nivel cortical, necrosis multifocal, con un infiltrado linfoplasmocítico generalizado, degeneración vacuolar hacia nivel cortical zonalmente extensivo, edema generalizado y espacio urinífero reducido ligeros. El becerro B8 presentó glomerulonefritis membranoproliferativa zonal moderada con edema medular y degeneración vacuolar en médula en dirección a los cálices renales, multifocales graves, congestión tubular hacia cortical zonalmente extensiva moderada y necrosis en médula focal ligera.

Figura 9. Lesiones histológicas en hígado.



Disociación de cordones hepáticos (flecha anaranjada), se observa un espacio marcado entre los mismos en comparación con los de la izquierda que guardan parcialmente su orden, marcados con una cruz anaranjada.

Inflamación y congestión en tejido hepático, por presencia de células inflamatorias como linfocitos y eritrocitos respectivamente. Área marcada con una estrella anaranjada.

PCRa

Al conocer el nivel de detección de ADN de *Leptospira* con los iniciadores que amplifican el gen *gspD* y *secY*, se realizaron las PCRa de las muestras de hígado, riñón y orina de los becerros. Los resultados obtenidos son los siguientes:

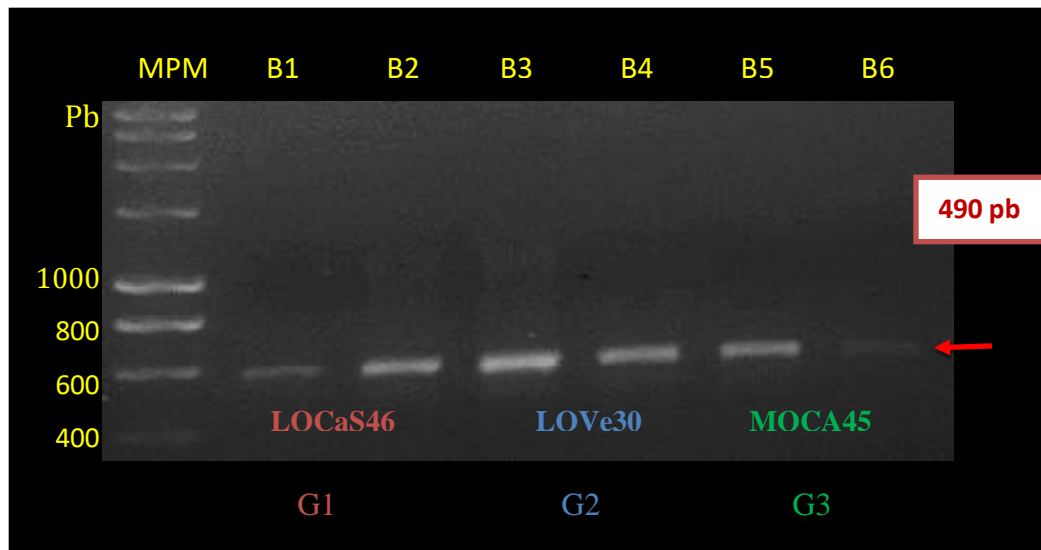
- Grupo1 LOCaS46: Los resultados de las muestras de PCRa de los órganos de los becerros dieron positivo al menos en un animal de cada grupo ya sea con los iniciadores que amplifican el gen *gspD* o *secY*; también dieron positivo en la muestra de orina del día 28 con el iniciador *gspD* (Cuadro 11; Figuras 10 a 13).
- Grupo2 LOVe30: Las muestras de hígado y de riñón de los becerros 4 y 5 dieron positivo a la PCRa con ambos iniciadores empleados en este estudio, pero no sucedió lo mismo con la muestra de orina que fue negativa en todos los casos (Cuadro 11; Figuras 10 a 13).
- Grupo3 MOCA45: El mismo caso que con el grupo 2, las muestras de hígado y riñón dieron positivo con ambos iniciadores empleados para el estudio, pero el de orina fue negativo en todos los casos (Cuadro 11; Figuras 10 a 13).

Cuadro 11. Resultados de PCRa de las diferentes muestras colectadas.

| Grupo/Becerro | Hígado | | Riñón | | Orina | |
|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | <i>gspD</i> | <i>secY</i> | <i>gspD</i> | <i>secY</i> | <i>gspD</i> | <i>secY</i> |
| G1/B1 | + | - | + | + | + | - |
| G1/B2 | + | - | + | - | + | - |
| G1/BC3 | NA | NA | NA | NA | - | - |
| G2/B4 | + | + | + | + | - | - |
| G2/B5 | + | + | + | + | - | - |
| G2/BC6 | NA | NA | NA | NA | - | - |
| G3/B7 | + | + | + | + | - | - |
| G3/B8 | + | + | + | + | - | - |
| G3/BC9 | NA | NA | NA | NA | - | - |

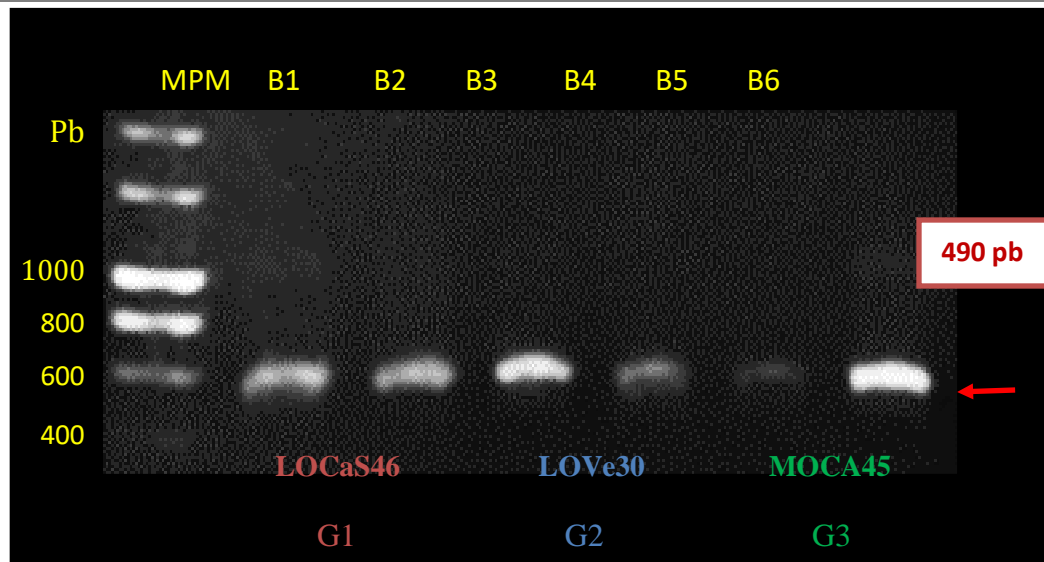
NA: No aplica; +: Positivos; -: negativos.

Figura 10. PCRa de Hígado de becerros con iniciadores *gspD*.



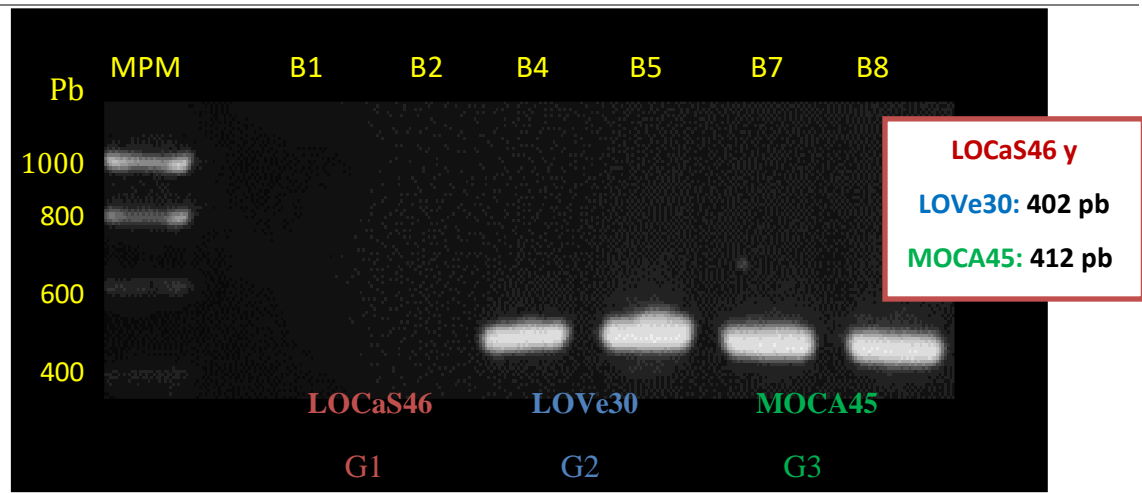
MPM: HyperLadder® 1kb (Bioline®); **B1 del G1 (Positivo); B2 del G1 (Positivo); B4 del G2 (Positivo); B5 del G2 (Positivo); B7 del G3 (Positivo); B8 del G3 (Positivo).** Fragmento de ADN esperado de **490 pb**.

Figura 11. PCRa de riñones de becerros con iniciadores *gspD*.



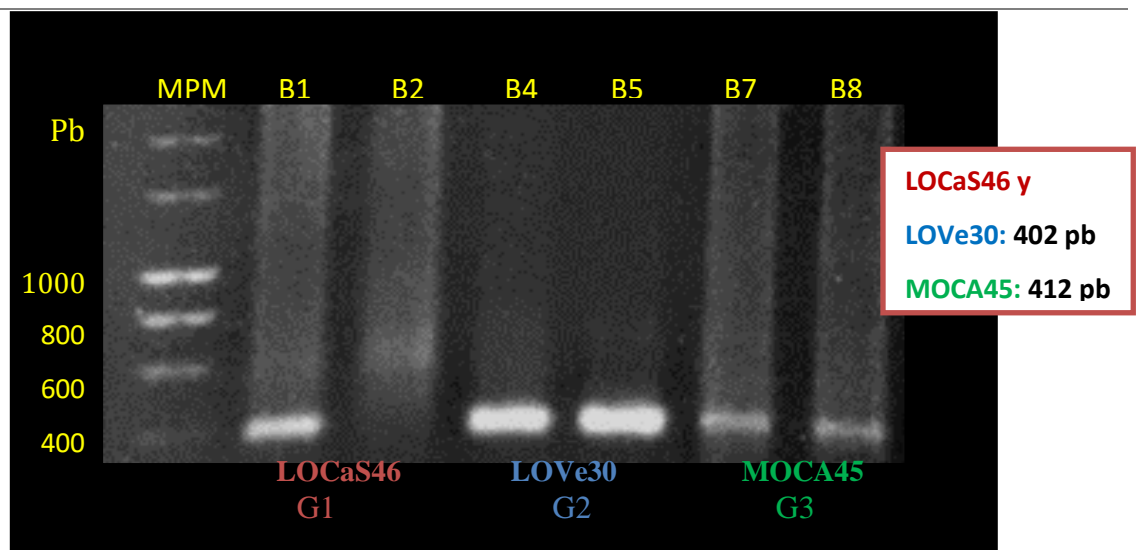
MPM: HyperLadder® 1kb (Bioline®); **B1 del G1 (Positivo); B2 del G1 (Positivo); B4 del G2 (Positivo); B5 del G2 (Positivo); B7 del G3 (Positivo); B8 del G3 (Positivo).** Fragmento de ADN esperado de **490 pb**.

Figura 12. PCRa de hígado de becerros con iniciadores *secY*.



MPM: HyperLadder® 1kb (Bioline®); **B1 del G1 (Negativo); B2 del G1 (Negativo); B4 del G2 (Positivo); B5 del G2 (Positivo); B7 del G3 (Positivo); B8 del G3 (Positivo).** Fragmento de ADN esperado de **402 pb** para los grupos **G1** y **G2**, y **412 pb** para el grupo **G3**.

Figura 13. PCRa de riñones de becerros con iniciadores *secY*.



MPM: HyperLadder® 1kb (Bioline®); **B1 del G1 (Positivo); B2 del G1 (Negativo); B4 del G2 (Positivo); B5 del G2 (Positivo); B7 del G3 (Positivo); B8 del G3 (Positivo).** Fragmento de ADN esperado de **402 pb** para los grupos **G1** y **G2**, y **412 pb** para el **G3**.

7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La leptospirosis tiene un impacto sanitario muy importante, que es considerada la enfermedad zoonótica con mayor distribución en el mundo (OMS, 2008). En medicina veterinaria tiene un impacto igualmente relevante en la salud de los animales domésticos, quienes pueden presentar una variedad de síndromes clínicos asociados con la diseminación característica de *Leptospira* a través del torrente sanguíneo, una vez que, en un ambiente contaminado, ha atravesado mucosas. En ese ambiente contaminado, los roedores (ratas y ratones), así como los perros, participan en la diseminación de la enfermedad como reservorios o portadores, respectivamente (Goarant *et al.*, 2022). Los animales de granja que incluyen tanto animales de esparcimiento y trabajo como los caballos, así como los de producción como cerdos y bovinos de engorda y de producción lechera son igualmente blanco de infección con Svs de *Leptospira*, presentando gran variedad de signos que dificultan el adecuado diagnóstico de la enfermedad (Adler y de la Peña-Moctezuma, 2010). La leptospirosis en estos animales se observa clínicamente desde las presentaciones asintomáticos leves, pasando por casos de uveítis recurrente en caballos (Divers, *et al.*, 2019), hasta la disminución de las capacidades reproductivas con presentación de abortos, mortinatos, momificaciones fetales, lechones o terneros débiles y agalactia en vacas y cerdos (Adler y de la Peña-Moctezuma, 2010). La problemática reproductiva trae además como consecuencia un impacto económico negativo; un estudio Americano realizado en el 2006 bajo sus condiciones, estimó una pérdida de en promedio 555 USD (dólares Americanos), añadiendo que por lo general la pérdida se incrementa a medida que avanza la gestación (De Vries, 2006). En otro estudio realizado en Corea sobre el impacto económico que trae una pérdida de la gestación, se consideró en aproximadamente \$ 2333 USD, y esto se debió en gran parte a un intervalo entre partos prolongado, al aumento de la matanza selectiva, y a un incremento en la tasa de desecho por consecuencia de una disminución en la fertilidad por endometritis (Lee y Kim, 2007). Este importante impacto, tanto económico como sanitario, ha conducido a la elaboración de inmunógenos para tratar de atenuar, si no eliminar, los estragos

causados por la leptospirosis desde hace más de un siglo (Barazzone, *et al.*, 2022). Inicialmente, los esfuerzos fueron enfocados a generar vacunas que previnieran la enfermedad en las especies animales afectadas, y dada la gran diversidad de Svs de *Leptospira* involucradas, tanto por especie animal como por región geográfica, encontrar la vacuna adecuada se convirtió en un reto desafiante que ha existido hasta ahora (Faine, *et al.*, 1999). Al fin del siglo XX, el paradigma del enfoque en el entendimiento del LPS como principal antígeno de *Leptospira* y por lo tanto el blanco potencial para la prevención de la leptospirosis mediante vacunas, cambió hacia la exploración de antígenos conservados -y no tan variables como el LPS- que pudieran inducir una respuesta inmune robusta y duradera contra la leptospirosis (Bulach, *et al.*, 2000). Es así como el GriLLep ha enfocado sus esfuerzos en el estudio de la proteína GspD, la cual está conservada entre Svs patógenas de *Leptospira* (Mena-Bañuelos, 2006; Rodríguez-Reyes, 2007; Ordóñez-López, 2010); ésta es fundamental para el metabolismo bacteriano de bacterias Gram negativas (Grasso, *et al.*, 2023), está presente en *Leptospira* en cantidades importantes que le hacen la décimo segunda proteína en abundancia en el género (Malmström, *et al.*, 2009), es antigénica y expresada durante la infección (Alcaraz-Sosa, 2008) y que, recientemente, pudimos comprobar su potencial inmunogénico en ensayos de desafío en hámsteres (Llanos Salinas, *et al.*, 2020). Como fue planteado en la justificación de este trabajo, se hace necesario probar la validez de biológicos en la especie blanco final, en cuyo caso los bovinos representan una de las principales especies afectadas por la leptospirosis. De aquí que en esta pieza de trabajo realizamos ensayos de infección experimental en becerros con la finalidad de obtener una herramienta fundamental si se quisiera probar a futuro inmediato el potencial de vacunas experimentales contra la leptospirosis en esta especie animal e inclusive, probar tratamientos específicos en ellos. Los resultados obtenidos en la reactivación de la virulencia de las cepas, tras hacer un pase en hámsteres, nos dio resultados esperados, teniendo al grupo de animales infectados con LOCaS46 con una presentación de infección aguda y su muerte al día 6, los del grupo de LOVe30 que murieron al día 8 con una infección intermedia, con lesiones

macroscópicas evidentes en los pulmones, pero menos graves que los del primer grupo y el tercero de MOCA45 que no murieron, tampoco tuvieron lesiones, pero sí se logró una colonización de *Leptospira* en los órganos. En cuanto a la presencia de anticuerpos de los hámsteres, los únicos que no presentaron títulos fueron los del grupo de LOCaS46 debido muy probablemente a que al presentar una muerte al día seis (infección aguda), no alcanzaron a producir anticuerpos que son detectables generalmente después de 10 a 14 días postinfección (Hathaway, *et al.*, 1983). Entre los resultados relevantes obtenidos en este estudio con relación a los becerros, es que los animales del grupo 1, infectados con la cepa LOCas46 de *L. interrogans* Sv Canicola, no mostraron aumento en el título de anticuerpos anti-*Leptospira*, además de que no mostraron cambios relevantes en el HG, sin embargo, en la BQ sí se observó una alteración importante de la GLDH, enzima presente en el núcleo de los hepatocitos (McDaniel, 1995), indicativa de daño hepático, además de una hiperfosforemia en el becerro B1 por la hemoconcentración, también puede llegar a ser común en animales jóvenes o se puede relacionar a una disminución en la filtración glomerular (Ochoa y Bouda, 2007); y una hipercaliemia en el becerro B2 que se puede asociar con una disminución en la filtración glomerular, o a un desequilibrio ácido-base mixto debido a una acidosis metabólica por diarreas recurrentes (Ochoa y Bouda, 2007). Por otro lado, el UA mostró la presencia de células epiteliales renales, lo que es relevante porque se sabe que de manera *in vitro* *Leptospira* se une a una variedad de líneas celulares como lo son las células endoteliales y las células epiteliales renales (Evangelista y Coburn, 2010); la presencia de proteinuria y cristaluria moderadas por estruvita puede estar presente en orinas alcalinas como lo es en este caso, sin embargo la proteinuria también se puede observar en enfermedades infecciosas como la leptospirosis (Ochoa y Bouda, 2007). Comparando estos resultados con los del becerro control, que tuvo presencia de células epiteliales transitorias en la muestra de orina, una cristaluria de ligera a moderada por estruvita y una proteinuria ligera, la ausencia de células epiteliales renales marca una importante diferencia. Además, durante la necropsia de los becerros del grupo 1 presentaron en general el hígado con engrosamiento de su cápsula, puntos

blanquecinos, congestión y hepatomegalia. En la observación macroscópica; mientras que microscópicamente se observó una hepatitis linfocítica periportal, disociación de cordones hepáticos con degeneración vacuolar, necrosis, congestión y edema intersticial. Existen pocos estudios que se han centrado en el daño hepático de animales con leptospirosis. Sin embargo se han observado en algunos estudios la presencia de citocinas proinflamatorias como la Proteína Inflamatoria de Macrófagos 1 α (MIP-1 α /CCL3), la interleucina 8 (IL-8) (da Silva, *et al.*, 2009). La citocina TNF α está asociada con la gravedad y la mortalidad en esta enfermedad, (Sun, *et al.*, 2020) y se sabe que en los hepatocitos genera apoptosis a través de la vía de las caspasas (Hatano, 2007). El aumento de citocinas proinflamatorias en el del hígado contribuye en la inflamación del tracto portal, teniendo como consecuencia una necrosis masiva (Matsui, *et al.*, 2011); en esta investigación se observaron casos de necrosis, en animales sanos infectados con *L. interrogans*. En los riñones, en el becerro B1 macroscópicamente se observó una congestión medular, con zonas blanquecinas y zonas hemorrágicas; en estudios pasados ya se han observado que las lesiones blanquecinas suelen estar relacionadas con nefritis intersticial por una infección con *Leptospira* (Yener y Keles, 2001; Azizi, *et al.*, 2012; Burgos Macías, *et al.*, 2020). Microscópicamente se observó una nefritis linfocítica e intersticial; mientras que en el becerro B2 se observó congestión, necrosis tubular, hemorragia zonal y degeneración vacuolar en corteza ligeros, además de edema. La infección por *Leptospira* puede ocasionar una nefritis túbulo-intersticial a través de componentes tóxicos de la membrana externa, seguida de la expresión de genes proinflamatorios como los son el óxido nítrico inducible (iNOS), la proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF α) (Yang, *et al.*, 2001). Estos hallazgos mostraron el daño causado por la infección con la cepa LOCas46, lo cual fue confirmado por la presencia de la bacteria demostrado mediante la PCRa, en donde los iniciadores específicos para el gen *gspD* detectaron como positivas las muestras de hígado, riñón y orina de los dos becerros infectados, y como negativas las muestras de orina del becerro control. Las PCRa para la detección del gen *secY* resultaron negativas. En el Grupo 2, infectado con la cepa LOVE30 de *L. interrogans*

Sv Icterohaemorrhagiae, a partir del día 14 post infección, se observó la presencia de anticuerpos anti Icterohaemorrhagiae, serovariedad contra la que fueron enfrentados, mostrando el título más alto de 1:400 en el caso del B4 y de 1:200 en el B5 también mostraron reacción cruzada contra otras serovariedades como AUT, CAN, COP, POM y PYR situación que puede llegar a ser común en infecciones iniciales, aún y si estas son de diferentes serogrupos (Haake y Levett, 2014); el BC6 tuvo la presencia de anticuerpos considerados como positivos contra la serovariedad Hardjoprajitno en la etapa de pre-inoculación, para las posteriores muestras fueron negativas, por lo mismo pierde su relevancia. El B4 del G2 comenzó a presentar alteraciones de manera muy temprana en el estudio, con una linfocitosis y leucocitosis desde el día 7 por estímulo antigénico postinfección, seguida en el día 14 por una inflamación ligera (leucocitosis y neutrofilia); se ha observado que la elevación del conteo de leucocitos y la neutrofilia están relacionadas con infecciones por *Leptospira* en humanos (Becirovic, *et al.*, 2020), además se sabe que los neutrófilos cumplen un papel importante en la captación fagocítica, la destrucción intracelular generando especies reactivas de oxígeno (ROS), gránulos citotóxicos, péptidos antimicrobianos y generando trampas extracelulares de neutrófilos (NET) ante una infección por *Leptospira* (Nathan, 2006; Scharrig, *et al.*, 2015). Sin embargo, en el día 28 sus resultados del B4 ya no mostraron alteraciones, a diferencia del B5 que tuvo cambios únicamente hasta el final del estudio presentando una inflamación aguda (neutrofilia); el becerro control el día 28 mostró cambios sugerentes a una infección aguda (leucocitosis, neutropenia y linfocitosis) por una posible infección, sin presencia de semiología. La BQ nos indica que el B4 presentó una hiperfosfatemia y el B5 y el BC6 no tuvieron cambios de relevancia. Los tres becerros presentaron una proteinuria grave, ictericia hepática por bilirrubinuria y urobilinuria y hemoglobinuria por un proceso hemolítico causado por hemolisinas que producen cepas como Pomona e Icterohaemorrhagiae (Ellis, 2015), también se observó la presencia de células epiteliales transitorias y renales. Los resultados de patología indicaron que macroscópicamente el hígado tenía zonas blancas multifocales sugerentes a necrosis hepática ligera multizonal coalescente; microscópicamente en el

becerro 4 se observó una hepatitis linfocítica focal ligera con congestión generalizada moderada, edema y disociación de cordones hepáticos generalizados, necrosis y hemorragias focales ligeras. Existe un reporte sobre la apoptosis de los hepatocitos de cuyos infectados con *L. interrogans* a las 48 horas postinfección, cuando la concentración bacteriana es baja, seguida de una necrosis a las 72 horas para su proliferación en este órgano (Merien, *et al.*, 1998). En riñones macroscópicamente se observaron áreas blancas multifocales, engrosamiento de la cápsula renal multifocal coalescente, una superficie ligeramente granular espacio entre la corteza y médula con áreas blancas (necrosis multifocal) y una congestión medular moderado multizonal; microscópicamente en los riñones se observó una nefritis intersticial focal ligera, con congestión tubular zonalmente extensiva grave y hemorragia focal ligera. El becerro 2 en el hígado mostró macroscópicamente bordes redondeados (hepatomegalia), y un color ligeramente rojo oscuro; microscópicamente resultó una hepatitis linfoplasmocítica focal moderada con necrosis focal, edema multizonal y disociación de cordones hepáticos zonal ligeros. Los riñones macroscópicamente mostraron un aumento de tamaño y una congestión medular moderada; microscópicamente se observó que los riñones presentaron necrosis focal, congestión en túbulos y hacia médula generalizada moderadas, edema y degeneración vacuolar generalizados ligeros. Las muestras de hígado y de riñón de los becerros 4 y 5 dieron positivo a la PCRa los iniciadores empleados en este estudio, pero no sucedió lo mismo con la muestra de orina que fue negativa en todos los casos. El grupo 3 de becerros infectados con MOCA45, solo el becerro 7 mostró anticuerpos anti Tarassovi, serovariedad a la que fueron enfrentados, con título 1:200 y ambos presentaron una reacción cruzada con AUT, CAN y COP. Los becerros B7 y B8 del G3 en el día 28 presentando una inflamación aguda por neutropenia por un consumo excesivo de estas células y linfocitosis por el estímulo antigénico. El BC9 se mantuvo sin alteraciones en todo el estudio. Al día 14 la elevación de la urea del becerro 7 y 8 se debió a la deshidratación, y el becerro 8 mostró un incremento de la GLDH que persistió hasta el día 28. En el UA el becerro B7 en el día 7 tuvo proteinuria grave, bilirrubinuria ligera y presencia de detritos celulares, en el día

14 se le sumó una urobilinuria moderada y para el día 28 presentó una hemoglobinuria ligera. El becerro B8 en el día 7 tuvo proteinuria moderada, bilirrubinuria ligera, en el día 14 la proteinuria fue ligera tuvo urobilinuria ligera, presencia de células transitorias 0-2/campo 400-X y células renales 1-3/campo 400X. El becerro control BC9 tuvo alteraciones similares a los animales infectados, en intensidad semejante, y cetonuria ligera en el día 28 por un trastorno ruminal (alcalosis ruminal) (Ochoa y Bouda, 2007). A la necropsia, macroscópicamente los becerros presentaron el hígado con un color pálido, con zonas blancas coalescentes (sugierentes a necrosis), con áreas de hemorragias de ligeras a moderadas (petequias, equimosis y sufusiones); microscópicamente el becerro 7 en el hígado mostró una disociación de cordones hepáticos generalizada moderada, con edema y congestión generalizados, necrosis focal y hemorragia zonal ligeros. El becerro 8 microscópicamente en hígado presentó una hepatitis linfoplasmocítica multifocal al azar ligera con disociación de cordones hepáticos generalizado y congestión multizonal moderados y edema generalizado ligero. Los riñones de los becerros macroscópicamente denotaron depresiones (posibles zonas de necrosis y reparación), petequias con distribución al azar, congestión ligera a moderada en médula, ligero aspecto granular, puntos blancos multifocales, superficie pálida y con congestión, corteza del riñón gruesa y congestionada; microscópicamente en el becerro 7 se observó congestión a nivel tubular hacia cortical zonalmente extensiva grave, necrosis multifocal, con un infiltrado linfoplasmocítico generalizado, degeneración vacuolar hacia cortical zonalmente extensivo, edema generalizado y espacio urinífero reducido ligeros. En un estudio para la detección de *Leptospira* en riñones de bovinos de matadero el hallazgo más común entre los animales positivos a la infección por PCR e inmunohistoquímica, fue el infiltrado inflamatorio linfoplasmocítico multifocal, con predominio de linfocitos en la región cortico-medular (Ajayi, *et al.*, 2020), como lo sucedido con el becerro 7. El becerro 8 presentó glomerulonefritis membranoproliferativa zonal moderada con edema en médula y degeneración vacuolar en médula y cálices renales multifocales graves, congestión tubular hacia cortical zonalmente extensiva moderada y necrosis

medular focal ligera. El daño glomerular en humanos con leptospirosis es muy limitado, a pesar de que se reporta una disminución en la filtración glomerular, los glomérulos mantienen un aspecto normal, casi intacto (Andrade, *et al.*, 2008), con los bovinos no es así, y se reportan casos de animales infectados por *Leptospira* con glomerulonefritis grave, y necrosante (Mineiro, *et al.*, 2011; Prakoso, *et al.*, 2020). Con la PCRa las muestras de hígado y riñón dieron positivo con ambos iniciadores empleados para el estudio, pero el de orina fue negativo en todos los casos. Como conclusión los resultados obtenidos a partir de la AM nos sugieren que los becerros infectados únicamente con LOVe30 y MOCA45 produjeron anticuerpos anti-*Leptospira*, presentado reacciones cruzadas con otras serovariedades, pero sólo los infectados con LOVe30 y el B7 infectado con MOCA45 presentaron anticuerpos contra la serovariedad a la que fueron expuestos. Se sabe que la prueba AM tiene una baja sensibilidad en bovinos y se pudiesen subestimar las infecciones reales, sin embargo es la prueba de oro en el diagnóstico de la leptospirosis con la que debemos seguir apoyándonos para el diagnóstico de la enfermedad (Prescott, *et al.*, 1988). Los resultados de patología nos indican y confirman que existen lesiones en hígado y riñón compatibles con una infección por leptospirosis, que, en algunos casos, aunque pocos llegaron a ser graves en los tres grupos de infección (LOCaS46, LOVe30 y MOCA45), desafortunadamente los animales control no pudieron ser analizados histopatológicamente por motivos externos al proyecto y no existió punto de comparación con los animales infectados. Lo que se observó en los hemogramas, bioquímicas y urianálisis nos dieron indicios de reacciones a antígenos inespecíficos y la presencia de una infección activa. El aislamiento de *Leptospira* es un confirmatorio definitivo, pero difícil de lograr por las complicaciones de contaminación (Johnson y Seiter, 1976), a pesar de la realización de diluciones que en estos medios ofrece la posibilidad óptima de un aislamiento exitoso, en este caso no se pudieron obtener. Por otro lado, la PCR también usada para el diagnóstico debido a su sensibilidad, no requiere la presencia de organismos viables, (Thaipadungpanit, *et al.*, 2011). Una PCR positiva nos muestra el reconocimiento del gen de la proteína GspD y de SecY presentes en este caso en leptospirosis patógenas, sin

identificar la serovariedad. La PCRa diseñada fue más sensible que la PCR punto final y en este caso detectó la presencia de ADN de *Leptospira* en los tejidos y en el ADN previamente probado en la concentración mínima de ADN de 0.002 ng/μl. Los becerros presentaron un daño renal y hepático ya descrito previamente, lo que nos permitirá usar estas serovariedades para el desafío en la evaluación de inmunógenos, demostrando si protegen o no al prevenir la infección por *Leptospira*. El Grupo de Investigación en *Leptospira* y Leptospirosis (GrILLeP), de la FMVZ, de la UNAM, ha desarrollado una vacuna experimental recombinante con una Proteína de Membrana Externa (PME) funcional y abundante, la secretina GspD del sistema de secreción tipo 2 bacteriano (T2SS), de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola, cepa LOCaS46 (rGspDLC) (Llanos Salinas, *et al.*, 2020). Se ha observado que GspDL está presente en todas las serovariedades patógenas (Rodríguez-Reyes, 2007), es expresada durante la infección e induce la producción de anticuerpos IgG (Alcaraz-Sosa, 2008). Dicha vacuna experimental, en hámster aplicado intramuscular a una dosis de 50 μg administrados con adyuvante incompleto de Freund, con refuerzo a los 14 días protegió en el desafío con cepas virulentas de *Leptospira* contra la enfermedad hasta un 75% de los hámsteres inmunizados, y al 50% contra la infección (Llanos Salinas, *et al.*, 2020). La inmunogenicidad generada por la proteína GspD no ha sido probada en bovinos y este estudio da pie a que se generen más pruebas para el uso de la proteína como una posible vacuna contra la leptospirosis en esta especie, pudiendo usar a las cepas LOCaS46, LOVe30 o MOCa45 para el desafío en esta especie y evaluar así su protección. Todos los grupos dieron positivo al menos en un animal ya sea con los iniciadores que amplifican el gen *gspD* o el que amplifica *secY*. La serovariedad Tarassovi con lo que se reportó anteriormente y, con el conocimiento previo de un estudio realizado en el país que nos habla de la presencia de la misma desde hace varios años en el ganado bovino (Moles Cervantes, *et al.*, 2002), nos indica que la cepa MOCA45 que recalando fue aislada a partir del riñón de un bovino, es la cepa más apropiada para un desafío y para evaluar lesiones características de la leptospirosis en bovinos, por las lesiones y presentaciones clínicas mostradas.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adler, B, de la Peña-Moctezuma, A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol*, 140(3), 287-296.
- Adler, B, Faine, S, Christopher, WL, Chappel, RJ. (1986). Development of an improved selective medium for isolation of leptospires from clinical material. *Vet Microbiol*, 12(4), 377-381.
- Adler, B, Murphy, AM, Locarnini, SA, Faine, S. (1980). Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*, 11(5), 452-457.
- Ahmed, A, Engelberts, MFM, Boer, KR, Ahmed, N, Hartskeerl, RA. (2009). Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. *PloS one*, 4(9).
- Ajayi, OL, Antia, RE, Awoyomi, OJ, Oladipo, TM, Adebowale, OO. (2020). Cultural, histochemical, and immunohistochemical detection of pathogenic *Leptospira* species in the kidneys of cattle slaughtered in two abattoirs in Southwest Nigeria. *J Immunoassay Immunochem*, 41(3), 337-353.
- Alcaraz-Sosa, LE. (2008). *Detección de la expresión de la secretina GSPDL, del sistema de secreción tipo 2 (T2SS) de Leptospira, mediante inmunohistoquímica*. UNAM, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México.
- Allen, JD, Meney, CL, Meney, CL. (1982). Evaluation of a Hardjo-Pomona vaccine to prevent leptospiruria in cattle exposed to a natural challenge with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *Aust Vet J*, 58(3), 93-96.
- Alt, DP, Zuerner, RL, Bolin, CA. (2001). Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. *J Am Vet Med*, 219(5), 636-639.
- Andrade, L, de Francesco Daher, E, Seguro, AC. (2008). *Leptospiral nephropathy*. Paper presented at the Seminars in nephrology.

- Artiushin SC, Timoney JF, Balasuriya UB, Erol E, SF, S. (2012). Real-time PCR for detection of *Leptospira interrogans* serovar Pomona type kennewicki in equine clinical specimens. *J Equine Vet Sci*, 32(S53).
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4-15.
- Azizi, S, Tajbakhsh, E, Hajimirzaei, MR, Varnamkhasti, MG, Sadeghian, H, Oryan, A. (2012). Evaluation of 'white-spotted kidneys' associated with leptospirosis by polymerase chain reaction based LipL32 gene in slaughtered cows. *J S Afr Vet Assoc*, 83(1), 1-5.
- Babudieri, B. (1951). Systematic Position of *Leptospira Hyos* S. and R. *Rend Ist Sup Sanit*, 530-531.
- Babudieri, B. (1968). A new technique for the purification of newly isolated *Leptospira* strains. *Bull World Health Organ*, 39(6), 939-940.
- Barazzone, GC, Teixeira, AF, Azevedo, BO, Damiano, DK, Oliveira, MP, Nascimento, AL, et al. (2022). Revisiting the development of vaccines against pathogenic *Leptospira*: innovative approaches, present challenges, and future perspectives. *Front Immunol*, 12, 760291.
- Becirovic, A, Numanovic, F, Dzafic, F, Piljic, D. (2020). Analysis of clinical and laboratory characteristics of patients with leptospirosis in five-year period. *J Mater Socio Med*, 32(1), 15.
- Bey, RF, Johnson, RC. (1986). Current status of leptospiral vaccines. *FAO: Prog Vet Microbiol Immunol* 2, 175-197.
- Bielanski, A, Surujballi, O. (1998). Penetration of in vitro fertilized bovine embryos by *Leptospira* after in vitro exposure. *Theriogenology*, 1(49), 250.
- Blumerman, SL, Wang, F, Herzig, CTA, Baldwin, CL. (2007). Molecular cloning of bovine chemokine receptors and expression by WC1+ $\gamma\delta$ T cells. *Dev Comp Immunol*, 31(1), 87-102.

- Bolin, CA, Alt, DP. (2001). Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. *Am J Vet Res* 62(7), 995-1000.
- Bolin, CA, Cassells, JA, Zuerner, RL, Trueba, G. (1991). Effect of vaccination with a monovalent *Leptospira interrogans* serovar Hardjo type Hardjo-bovis vaccine on type Hardjo-bovis infection of cattle. *Am J Vet Res* 52(10), 1639-1643.
- Bolin, CA, Thiermann, AB, Handsaker, AL, Foley, JW. (1989a). Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar Hardjo type Hardjo-bovis infection of pregnant cattle. *Am J Vet Res* 50(1), 161-165.
- Bolin, CA, Zuerner, RL, Trueba, G. (1989b). Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine containing *Leptospira interrogans* serovar Hardjo type Hardjo-bovis on type Hardjo-bovis infection of cattle. *Am J Vet Res* 50(12), 2004-2008.
- Bomfim, MRQ, Ko, A, Koury, MC. (2005). Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Vet Microbiol*, 109(1-2), 89-94.
- Bourhy, P, Bremont, S, Zinini, F, Giry, C, Picardeau, M. (2011). Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira spp.* in blood and identification of variations in target sequences. *J Clin Microbiol*, 49(6), 2154-2160.
- Brown, PD, Carrington, DG, Gravekamp, C, Van De Kemp, H, Edwards, CN, Jones, SR, *et al.* (2003a). Direct detection of leptospiral material in human postmortem samples. *Res Microbiol*, 154(8), 581-586.
- Brown, RA, Blumerman, S, Gay, C, Bolin, C, Duby, R, Baldwin, CL. (2003b). Comparison of three different leptospiral vaccines for induction of a type 1 immune response to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. *Vaccine*, 21(27-30), 4448-4458.
- Bulach, DM, Kalambaheti, T, de la Peña-Moctezuma, A, Adler, B. (2000). Lipopolysaccharide biosynthesis in *Leptospira*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2(4), 375-380.

- Burgos Macías, DI, Bulnes Goicochea, CA, Ruano, MP, Revelo Ruales, AP, Falconí Flores, MA, Vera Loor, L, *et al.* (2020). Asociación entre la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* y lesiones renales en bovinos. *Rev de Investig Vet del Perú*, 31(4).
- Cameron, CE. (2015). Leptospiral structure, physiology, and metabolism. *Vet Microbiol*, 21-41.
- Carmona-Gasca, CA. (2011). *Evaluación de gspD para la tipificación de aislados de Leptospira mediante la secuenciación de Locus Múltiples (MLST)*. UNAM, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México.
- Carmona-Gasca, CA, León Lara, L, Castillo-Sánchez, LO, Ramírez-Ortega, JM, Ko, A, Luna Palomera, C, *et al.* (2011). Detección de *Leptospira santarosai* y *L. kirschneri* en bovinos: nuevos aislados con potencial impacto en producción bovina y salud pública. *Vet Mex*, 42(4), 277-288.
- Castillo-Sánchez, LO. (2008). *Detección de perros portadores de leptospiras patógenas: estudio bacteriológico, serológico, histopatológico y molecular.*, UNAM, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México.
- Cavalier-Smith, T. (2002). The neomuran origin of archaebacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52(1), 7-76.
- Cerqueira, GM, McBride, AJA, Hartskeerl, RA, Ahmed, N, Dellagostin, OA, Eslabão, MR, *et al.* (2010). Bioinformatics describes novel loci for high resolution discrimination of *Leptospira* isolates. *PLoS One*, 5(10).
- Chakraborty, A, Miyahara, S, Villanueva, SYAM, Saito, M, Gloriani, NG, Yoshida, Si. (2011). A novel combination of selective agents for isolation of *Leptospira* species. *Microbiol Immunol*, 55(7), 494-501.
- Chalayon, P, Chanket, P, Boonchawalit, T, Chattanadee, S, Srimanote, P, Kalambaheti, T. (2011). Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 105(5), 289-297.

- Chang, Y-F, Chen, C-S, Palaniappan, RUM, He, H, McDonough, SP, Barr, SC, *et al.* (2007). Immunogenicity of the recombinant leptospiral putative outer membrane proteins as vaccine candidates. *Vaccine*, 25(48), 8190-8197.
- Chappel, RJ, Prime, RW, Millar, BD, Mead, LJ, Jones, RT, Adler, B. (1992). Comparison of diagnostic procedures for porcine leptospirosis. *Vet Microbiol*, 30(2), 151-163.
- Chávez, TR. (2006). *Análisis de los resultados obtenidos en el diagnóstico serológico de Leptospirosis en animales, de 1989 a 2004 en el departamento de Microbiología e Inmunología, FMVZ-UNAM UNAM, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México.*
- Cheuquepán, VF, Recavarren, M, Quintana, S, Cantón, G, Odeón, A, Marin, M, *et al.* (2020). Improvement of *Leptospira spp.* diagnosis in aborted bovine fetuses by qPCR. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 73, 101555.
- Chideroli, RT, Pereira, UP, Gonçalves, DD, Nakamura, AY, Alfieri, AA, Alfieri, AF, *et al.* (2016). Isolation and molecular characterization of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo strain Hardjobovis in the urine of naturally infected cattle in Brazil. *Genet Mol Res*, 15(1), 19.
- Coffman, RL, Sher, A, Seder, RA. (2010). Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*, 33(4), 492-503.
- CONAGUA. (2018-2019). Resúmenes Mensuales de Temperaturas y Lluvia. Retrieved from <https://smn.conagua.gob.mx/es/climatologia/temperaturas-y-lluvias/resumenes-mensuales-de-temperaturas-y-lluvias>
- Coons, AH, Creech, HJ, Jones, RN. (1941). Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med*, 47(2), 200-202.
- Cortese, VS, Gallo, GF, Cleary, DL, Galvin, JE, Leyh, RD. (2014). Efficacy of a flexible schedule for administration of a *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo bacterin to beef calves. *Am J Vet Res*, 75(5), 507-512.
- Cousineau, JG, McKiel, JA. (1961). In vitro sensitivity of *Leptospira* to various antimicrobial agents. *Can J Microbiol*, 7(5), 751-758.

- Cousins, D, Robertson, G, Hustas, L. (1985). The use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect the IgM and IgG antibody response to *Leptospira interrogans* serovars Hardjo, Pomona and Tarassovi in cattle. *Vet Microbiol*, 10(5), 439-450.
- Cullen, PA, Cordwell, SJ, Bulach, DM, Haake, DA, Adler, B. (2002). Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar lai. *Infect Immun*, 70(5), 2311-2318.
- Cullen, PA, Haake, DA, Bulach, DM, Zuerner, RL, Adler, B. (2003). LipL21 Is a Novel Surface-Exposed Lipoprotein of Pathogenic *Leptospira* Species. *Infect Immun*, 71(5), 2414-2421.
- da Cunha, CEP, Bettin, EB, Bakry, AFAAY, Neto, ACPS, Amaral, MG, Dellagostin, OA. (2019). Evaluation of different strategies to promote a protective immune response against leptospirosis using a recombinant LigA and LigB chimera. *Vaccine*, 37(13), 1844-1852.
- da Silva, JB, Ramos, TM, De Franco, M, Paiva, D, Ho, PL, Martins, EA, *et al.* (2009). Chemokines expression during *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni infection in resistant BALB/c and susceptible C3H/HeJ mice. *Microb Pathog*, 47(2), 87-93.
- De Vries, A. (2006). Economic value of pregnancy in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 89(10), 3876-3885.
- Divers, TJ, Chang, YF, Irby, NL, Smith, JL, Carter, CN. (2019). Leptospirosis: An important infectious disease in North American horses. *Equine Vet J*, 51(3), 287-292.
- Doosti, A, Tamimian, NH. (2011). Diagnosis of leptospiral abortion in bovine by polymerase chain reaction. *Glob Vet*, 7(1), 79-82.
- Ellinghausen, HC, Jr., McCullough, WG. (1965). Nutrition of *Leptospira* Pomona and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am J Vet Res*, 26, 45-51.
- Ellis, WA. (1983). Recent developments in bovine leptospirosis. *Vet J*.

- Ellis, WA. (1984). Bovine leptospirosis in the tropics: prevalence, pathogenesis and control. *Prev Vet Med*, 2(1-4), 411-421.
- Ellis, WA. (1994). Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet Clin N Am - Food Anim Pract*, 10(3), 463-478.
- Ellis, WA. (2015). Animal leptospirosis. *Vet Microbiol*, 99-137.
- Ellis, WA, Cassells, J, Doyle, J. (1986a). Genital leptospirosis in bulls. *Vet Rec*, 118(12), 333.
- Ellis, WA, Michna, SW. (1976). Bovine leptospirosis: infection by the *Hebdomadis* serogroup and abortion-A herd study. *Vet Rec*, 99(21), 409-412.
- Ellis, WA, Montgomery, J, Cassells, JA. (1985a). Dihydrostreptomycin treatment of bovine carriers of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *Res Vet Sci*, 39(3), 292-295.
- Ellis, WA, O'Brien, J, Cassells, J. (1981). Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype Hardjo infection in Northern Ireland. *Vet Rec*, 108(26), 555-557.
- Ellis, WA, O'Brien, JJ, Bryson, DG, Mackie, DP. (1985b). Bovine leptospirosis: some clinical features of serovar Hardjo infection. *Vet Rec*, 117(5), 101-104.
- Ellis, WA, O'Brien, JJ, Cassells, JA, Neill, SD, Hanna, J. (1985c). Excretion of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo following calving or abortion. *Res Vet Sci*, 39(3), 296-298.
- Ellis, WA, Songer, JG, Montgomery, J, Cassells, JA. (1986b). Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in the genital and urinary tracts of non-pregnant cattle. *Vet Rec*, 118(1), 11-13.
- Engvall, E, Jonsson, K, Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim Biophys-Acta Bioenerg*, 251(3), 427-434.

- Evangelista, KV, Coburn, J. (2010). *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol*, 5(9), 1413-1425.
- Evangelista, KV, Lourdault, K, Matsunaga, J, Haake, DA. (2017). Immunoprotective properties of recombinant LigA and LigB in a hamster model of acute leptospirosis. *PloS One* 12(7).
- Faine, S. (1982). *Guidelines for the control of leptospirosis*. Ginebra: WHO.
- Faine, S. (1994). *Leptospira* and leptospirosis.
- Faine, S, Adler, B, Bolin, C, Perolat, P. (1999). *Leptospira* and Leptospirosis. *Melbourne, Australia: MedSci*.
- Faisal, SM, Yan, W, Chen, C-S, Palaniappan, RUM, McDonough, SP, Chang, Y-F. (2008). Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. *Vaccine*, 26(2), 277-287.
- Felix, CR, Siedler, BS, Barbosa, LN, Timm, GR, McFadden, J, McBride, AJ. (2020). An overview of human leptospirosis vaccine design and future perspectives. *Expert Opin Drug Deliv*, 15(2), 179-188.
- Ferguson, IR. (1993). Leptospirosis surveillance: 1990-1992. *Commun Dis Rep. CDR Rev*, 3(3), R47-48.
- Flannery, B, Costa, D, Carvalho, FP, Guerreiro, H, Matsunaga, J, Da Silva, ED, *et al.* (2001). Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol*, 39(9), 3303-3310.
- Flores-Popoca, EO. (2006). *Estudios del locus gsp del sistema de transporte tipo II de Leptospira interrogans serovariedad Icterohaemorrhagiae*. UNAM, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México.
- Forster, KM, Hartwig, DD, Seixas, FK, Bacelo, KL, Amaral, M, Hartleben, CP, *et al.* (2013). A conserved region of leptospiral immunoglobulin-like A and B proteins as a DNA vaccine elicits a prophylactic immune response against leptospirosis. *Clin Vaccine Immunol*, 20(5), 725-731.

- Fouts, DE, Matthias, MA, Adhikarla, H, Adler, B, Amorim-Santos, L, Berg, DE, *et al.* (2016). What makes a bacterial species pathogenic?: comparative genomic analysis of the genus *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(2).
- Francetic, O, Belin, D, Badaut, C, Pugsley, AP. (2000). Expression of the endogenous type II secretion pathway in *Escherichia coli* leads to chitinase secretion. *EMBO J*, 19(24), 6697-6703.
- Freitas, JCd, Silva, FGd, Oliveira, RCd, Delbem, ÁCB, Müller, EE, Alves, LA, *et al.* (2004). Isolation of *Leptospira spp* from dogs, bovine and swine naturally infected. *Cienc Rural*, 34, 853-856.
- García, S. (2004). *Leptospirosis en humanos, situación en México*. Paper presented at the Memorias del simposio internacional sobre *Leptospira* y Leptospirosis en Américas., México, CDMX.
- Garfias, CRB. (2011). Importancia de los linfocitos T $\gamma\delta$ en la respuesta inmunitaria de los bovinos. *Vet Mex*, 42(1), 65-75.
- Goarant, C, Adler, B, de la Peña-Moctezuma, A. (2022). *Leptospira*. In *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals* (5a ed., pp. 502-527): Wiley Online Library.
- Grasso, S, Dabene, V, Hendriks, MMWB, Zwartjens, P, Pellaux, R, Held, M, *et al.* (2023). Signal Peptide Efficiency: From High-Throughput Data to Prediction and Explanation. *ACS Synthetic Biology*.
- Green, MR, Sambrook, J. (2019). Nested polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc*, 2019(2).
- Grooms, DL, Bolin, CA. (2005). Diagnosis of fetal loss caused by bovine viral diarrhea virus and *Leptospira spp*. *Vet Clin N Am - Food Anim Pract*, 21(2), 463-472.
- Guernier, V, Allan, K, Goarant, C. (2018). Advances and challenges in barcoding pathogenic and environmental *Leptospira*. In (Vol. 145, pp. 595–607): Parasitology.
- Haake, DA, Champion, CI, Martinich, C, Shang, ES, Blanco, DR, Miller, JN, *et al.* (1993). Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a

- transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. *J Bacteriol*, 175(13), 4225-4234.
- Haake, DA, Chao, G, Zuerner, RL, Barnett, JK, Barnett, D, Mazel, M, *et al.* (2000). The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun*, 68(4), 2276-2285.
- Haake, DA, Levett, PN. (2014). Leptospirosis in humans. In Adler, B (Ed.), *Leptospira and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 387, pp. 65-97). Berlín, Heidelberg: Springer.
- Haake, DA, Martinich, C, Summers, TA, Shang, ES, Pruetz, JD, McCoy, AM, *et al.* (1998). Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection. *Infect Immun*, 66(4), 1579-1587.
- Haake, DA, Matsunaga, J. (2002). Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. *Infect Immun*, 70(9), 4936-4495.
- Haake, DA, Zückert, WR. (2015). The leptospiral outer membrane. *Vet Microbiol*, 187-221.
- Haghenbeck, FA, de la Lama, I, Grupo Ecologista, F, San Francisco, A. (2014). NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. *Norma Oficial Mexicana*
- Hamond, C, Martins, G, Loureiro, AP, Pestana, C, Lawson-Ferreira, R, Medeiros, MA, *et al.* (2014). Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock. *Vet Res Commun*, 38(1), 81-85.
- Hatano, E. (2007). Tumor necrosis factor signaling in hepatocyte apoptosis. *J Gastroenterol Hepatol*, 22, S43-S44.
- Hathaway, S, Ellis, W, Little, T, Stevens, A, Ferguson, H. (1983). *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in pigs: a new host-parasite relationship in the United Kingdom. *Vet Rec*.

- Higgins, RJ, Harbourne, JF, Little, TW, Stevens, AE. (1980). Mastitis and abortion in dairy cattle associated with *Leptospira* of the serotype Hardjo. *Vet Rec*, 107(13), 307-310.
- Hornbeck, P. (1992). Enzyme-linked immunosorbent assays. *Curr Protoc Immunol* 1(1), 2.1.1-2.1.22.
- Hsieh, W-J, Chang, Y-F, Chen, C-s, Pan, M-J. (2005). Omp52 is a growth-phase-regulated outer membrane protein of *Leptospira santarosai* serovar Shermani. *FEMS Microbiol Lett*, 243(2), 339-345.
- Hubener, E. (1915). Beitrage zur Aetiologie der Weilschen Krankheit. Mitteilung I. *Dtsch Med Wochenschr*, 41, 1275-1277.
- Inada, R. (1915). Preliminary report on the identification of a causative spirochete (a new species) *Fukuoka Ikadaigaku Zasshi* 8, 368-369.
- Isogai, E, Isogai, H, Kurebayashi, Y, Ito, N. (1986). Biological activities of leptospiral lipopolysaccharide. *Zent bl Bakteriol*, 261(1), 53-64.
- Isogai, E, Kitagawa, H, Isogai, H, Matsuzawa, T, Shimizu, T, Yanagihara, Y, *et al.* (1989). Effects of leptospiral lipopolysaccharide on rabbit platelets. *Zent bl Bakteriol*, 271(2), 186-196.
- Johnson, DW. (1950). The Australian leptospiroses. *Med J Aust*, 2(20), 724-731.
- Johnson, R, Seiter, C. (1976). *Leptospira* and their cultivation. *Monograph Reheis Chem Co*, 1-13.
- Johnson, RC, Harris, VG. (1967). Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire I. Growth at low temperatures. *J Bacteriol*, 94(1), 27-31.
- Kathe, J. (1943). Infektionen mit *Leptospira grippotyphosa* bei Tieren und ihre Bedeutung für die Epidemiologie des Schlamm-Feldfiebers. *Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie*, 103(1), 60-77.
- Kingscote, B. (1985). Leptospirosis in sheep in Western Canada. *Can Vet J*, 26(5), 164-168.
- Klarenbeek, A, Schüffner, W. (1933). Het voorkomen van een afwijkend leptospira-ras in Nederland. *Ned Tijdschr Geneesk*, 77, 4271-4276.

- Ko, AI, Goarant, C, Picardeau, M. (2009). *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*, 7(10), 736-747.
- Koizumi, N, Watanabe, H. (2003). Molecular cloning and characterization of a novel leptospiral lipoprotein with OmpA domain. *FEMS Microbiol Lett*, 226(2), 215-219.
- Kolb, E, Gürtler, H. (1974). *Fisiología veterinaria* (1a ed. Vol. 2). Zaragoza: Acribia.
- Krivacek, O. (1924). β pirachaitenbefunde beim Hundetyphus. *Zeit Hyg Infektionskr*, 103(3), 529-532.
- Krumbein, R, Frieling, B. (1916). Zur Weilschen Krankheit. *Dtsch Med Wochenschr*, 42(19), 564-566.
- Lawrence, J. (1951). The growth of Leptospirae in semi-solid media. *Aust J Med Sci*, 29(3).
- Lee, J-I, Kim, I-H. (2007). Pregnancy loss in dairy cows: the contributing factors, the effects on reproductive performance and the economic impact. *J Vet Sci*, 8(3), 283-288.
- Lee, S, Nguyen, MT. (2015). Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. *Immune Netw*, 15(2), 51-57.
- Levett, PN. (2001). Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*, 14(2), 296-326.
- Levett, PN. (2004). Leptospirosis: A forgotten zoonosis? *Clin Appl Immunol Rev*, 4(6), 435-448.
- Levett, PN, Morey, RE, Galloway, RL, Steigerwalt, AG. (2006). *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. *Int J Syst Evol Micribiol*, 56(3), 671-673.
- Limmathurotsakul, D, Turner, EL, Wuthiekanun, V, Thaipadungpanit, J, Suputtamongkol, Y, Chierakul, W, et al. (2012). Fool's gold: Why imperfect reference tests are undermining the evaluation of novel diagnostics: a reevaluation of 5 diagnostic tests for leptospirosis. *Clin Infect Dis*, 55(3), 322-331.

- Llanos Salinas, SP, Castillo Sánchez, LO, Castañeda Miranda, G, Rodríguez Reyes, EA, Ordoñez López, L, Mena Bañuelos, R, *et al.* (2020). GspD, The Type II Secretion System Secretin of *Leptospira*, Protects Hamsters against Lethal Infection with a Virulent *L. interrogans* Isolate. *Vaccines*, 8(4), 759.
- Lourdault, K, Aviat, F, Picardeau, M. (2009). Use of quantitative real-time PCR for studying the dissemination of *Leptospira interrogans* in the guinea pig infection model of leptospirosis. *J Med Microbiol*, 58(5), 648-655.
- Loureiro, AP, Lilenbaum, W. (2020). Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. *Theriogenology*, 141, 41-47.
- Lucchesi, P, Arroyo, GH, Etcheverría, AI, Parma, AE, Seijo, AC. (2004). Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. *Rev Soc Bras Med Trop*, 37(2), 131-134.
- Mackintosh, CG, Marshall, RB, Broughton, E. (1980). The use of a Hardjo-Pomona vaccine to prevent leptospiuria in cattle exposed to natural challenge with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *N Z Vet J*, 28(9), 174-177.
- Malmström, J, Beck, M, Schmidt, A, Lange, V, Deutsch, EW, Aebersold, R. (2009). Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nature*, 460(7256), 762-765.
- Martin, L, Pettit, A. (1918). Séro-diagnostic de la spirochète ictérohémorragiae. *Bull Mem Soc Med Hop Paris* 42, 672 - 675.
- Martín, PL, Arauz, MS, Stanchi, NO. (2015). Diagnóstico de leptospirosis mediante técnicas moleculares: ventajas y limitaciones en Medicina Veterinaria. *Analecta Vet*, 35.
- Martins, G, Lilenbaum, W. (2017). Control of bovine leptospirosis: Aspects for consideration in a tropical environment. *Res Vet Sci*, 112, 156-160.
- Matsui, M, Rouleau, V, Bruyère-Ostells, L, Goarant, C, immunity. (2011). Gene expression profiles of immune mediators and histopathological findings in animal models of leptospirosis: comparison between susceptible hamsters and resistant mice. *J Infection*, 79(11), 4480-4492.

- Matsunaga, J, Barocchi, MA, Croda, J, Young, TA, Sanchez, Y, Siqueira, I, *et al.* (2003). Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microb*, 49(4), 929-946.
- Matsunaga, J, Sanchez, Y, Xu, X, Haake, DA. (2005). Osmolarity, a Key Environmental Signal Controlling Expression of Leptospiral Proteins LigA and LigB and the Extracellular Release of LigA. *Infect Immun*, 73(1), 70-78.
- Matsunaga, J, Werneid, K, Zuerner, RL, Frank, A, Haake, DA. (2006). LipL46 is a novel surface-exposed lipoprotein expressed during leptospiral dissemination in the mammalian host. *Microbiology* 152(Pt 12), 3777-3786.
- Matsunaga, J, Young, TA, Barnett, JK, Barnett, D, Bolin, CA, Haake, DA. (2002). Novel 45-kilodalton leptospiral protein that is processed to a 31-kilodalton growth-phase-regulated peripheral membrane protein. *Infect Immun*, 70(1), 323-334.
- McDaniel, HG. (1995). Comparison of the Primary Structure of Nuclear and Mitochondrial Glutamate-Dehydrogenase from Bovine Liver. *Arch Biochem Biophys*, 319(1), 316-321.
- Mena-Bañuelos, R. (2006). *Análisis in silico de los genes gspD_L y gspE_L del sistema de secreción tipo-II de Leptospira biflexa Serovariedad Patoc.*, UNAM, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México.
- Merien, F, Truccolo, J, Rougier, Y, Baranton, G, Perolat, P. (1998). In vivo apoptosis of hepatocytes in guinea pigs infected with *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. *FEMS Microbiol Lett*, 169(1), 95-102.
- Mikhin, NA, Azinov, SA. (1935). Spirochaetal jaundice of cattle in North Caucasus. *Sovyet Vet*, 10, 23-27.
- Mikhin, NA, Azinow, SA, Salikov. (1941). Study of morphological, cultural, and virulent characteristics of *Leptospira ictero-haemoglobinuria vitulorum*. *Vet Moscú*, 1, 51-55.
- Milner, AR, Wilks, CR, Calvert, K. (1980). The prevalence of antibodies to members of *Leptospira interrogans* in cattle. *Aust Vet J*, 56(7), 327-330.

- Mineiro, ALBB, Vieira, RJ, Costa, ÉA, Santos, RL, Gonçalves, LMF, Carvalho, SM, *et al.* (2011). Serology, polymerase chain reaction and histopathology for leptospirosis in samples collected at slaughter from dairy cows of Parnaíba region, state of Piauí, Brazil. *31*, 859-866.
- Mino, P. (1938). Serological Confirmation of Spirochaetosis in the Province of Vercelli. *G Accad Med Torino*, *101*(Pt. 2), 99-106.
- Miraglia, F, Moraes, ZMd, Melville, PA, Dias, RA, Vasconcellos, SA. (2009). EMJH medium with 5-fluorouracil and nalidixic acid associated with serial dilution technique used to recover *Leptospira spp* from experimentally contaminated bovine semen. *Braz J Microbiol*, *40*, 189-193.
- Moles Cervantes, LP, Cisneros Puebla, MA, Rosas, DG, Serranía, NR, Torres Barranca, JI. (2002). Serological study of bovine leptospirosis in Mexico. *Rev Cub Med Trop*, *54*(1), 24-27.
- Morey, RE, Galloway, RL, Bragg, SL, Steigerwalt, AG, Mayer, LW, Levett, PN. (2006). Species-specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol*, *44*(10), 3510-3516.
- Morris, J, Hussaini, S. (1974). Characterization of the antibodies detected by the microscopic agglutination test for bovine leptospirosis. *Epidemiol Infect*, *73*(3), 425-432.
- Morris Quevedo, HJ, Martínez Manrique, C, Abdala Díaz, RT, Campos Orama, D. (1999). Adyuvantes inmunológicos. *Rev Cuba de Investig Biomed*, *18*(2), 130-137.
- Myers, DM. (1985). Manual de métodos, para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis. In *Manual de métodos, para el diagnóstico de laboratorio de la Leptospiriosis* (pp. 46-46).
- Naiman, BM, Alt, D, Bolin, CA, Zuerner, R, Baldwin, CL. (2001). Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and $\gamma\delta$ T lymphocytes. *Infect Immun*, *69*(12), 7550-7558.
- Naiman, BM, Blumberman, S, Alt, D, Bolin, CA, Brown, R, Zuerner, R, *et al.* (2002). Evaluation of type 1 immune response in naïve and vaccinated animals following

- challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: involvement of WC1+ $\gamma\delta$ and CD4 T cells. *Infect Immun*, 70(11), 6147-6157.
- Naskar, S, Hohl, M, Tassinari, M, Low, HH. (2021). The structure and mechanism of the bacterial type II secretion system. *Mol Microb*, 115(3), 412-424.
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*, 6(3), 173-182.
- Nervig, R, Ellinghausen Jr, H. (1978). Viability of *Leptospira interrogans* serotype grippityphosa in swine urine and blood. *Cornell Vet*, 68(1), 70-77.
- Noguchi, H, Kligler, IJ. (1920). Immunological studies with a strain of *Leptospira* isolated from a case of yellow fever in Mérida, Yucatán. *J Exp Med*, 32(5), 627-637.
- Ochoa, LN, Bouda, J. (2007). *Patología clínica veterinaria*: UNAM, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- OMS. (1967). *Problemas actuales de las investigaciones sobre leptospirosis*. Paper presented at the Informe de un Grupo de Expertos del World Health Organization, Moscú (18 al 21 de julio de 1966).
- OMS. (2008). *Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control*. Paper presented at the Centro Panamericano de Fiebre Aftosa -VP/OPS/OMS, Rio de Janeiro.
- Ooteman, MC, Vago, AR, Koury, MC. (2006). Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *J Microbiol Methods*, 65(2), 247-257.
- Ordóñez-López, L. (2010). *Comparación de la organización genética de los LOCI gsp en 2 cepas de Leptospira interrogans serovariedad Canicola*, UNAM, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México.
- Palaniappan, RUM, Chang, Y-F, Jusuf, SSD, Artiushin, S, Timoney, JF, McDonough, SP, et al. (2002a). Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun*, 70(11), 5924-5930.

- Palaniappan, RUM, Chang, Y-F, Jusuf, SSD, Artiushin, S, Timoney, JF, McDonough, SP, *et al.* (2002b). Cloning and Molecular Characterization of an Immunogenic LigA Protein of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun*, 70(11), 5924-5930.
- Palmer, M, Zochowski, W. (2000). Survival of leptospires in commercial blood culture systems revisited. *J Clin Pathol*, 53(9), 713-714.
- Perez, J, Goarant, C. (2010). Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. *BMC Microbiol*, 10(1), 1-11.
- Picardeau, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect*, 43(1), 1-9.
- Picardeau, M. (2017). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nat Rev Microbiol*, 15, 297-307.
- Picardeau, M, Bertherat, E, Jancloes, M, Skouloudis, AN, Durski, K, Hartskeerl, RA. (2014). Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 78(1), 1-8.
- Pinhata, JMW, Blanco, RM, Romero, EC. (2018). Evaluation of inhibitors for development of a selective medium for isolation of *Leptospira spp.* from clinical samples. *Lett Appl Microbiol*, 66(6), 558-564.
- Prakoso, YA, Widyarini, S, Kurniasih, K. (2020). Histopathology of the organs from cattle with leptospirosis. *J Adv Anim Vet Sci*, 8(11), 1220-1224.
- Prescott, JF, Miller, RB, Nicholson, VM, Martin, SW, Lesnick, T. (1988). Seroprevalence and association with abortion of leptospirosis in cattle in Ontario. *Can J Vet Res*, 52(2), 210.
- Raja, V, Natarajaseenivasan, K. (2015). Pathogenic, diagnostic and vaccine potential of leptospiral outer membrane proteins (OMPs). *Crit Rev Microbiol*, 41(1), 1-17.
- Rinehart, CL, Zimmerman, AD, Buterbaugh, RE, Jolie, RA, Chase, CC. (2012). Efficacy of vaccination of cattle with the *Leptospira interrogans* serovar Hardjo type Hardjoprajitno component of a pentavalent *Leptospira* bacterin against experimental challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo type Hardjo-bovis. *Am J Vet Res*, 73(5), 735-740.

- Rodríguez-Reyes, EA. (2007). *Antigenicidad de la proteína de membrana externa GspDL, la supuesta secretina del T2SS de Leptospira borgpetersenii serovariedad Hardjo (Hardjobovis)*. UNAM, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México.
- Roth, E, Galton, MM. (1960). Isolation and identification of *Leptospira* Hardjo from cattle in Louisiana. *Am J Vet Res*, 21, 422-427.
- Saglam, YS, Yildirim, S, Ozkaraca, M, Altun, S. (2022). Investigation of leptospiral antigen with immunohistochemical and immunofluorescence methods in cattle kidney. *Microb Pathog*, 164, 105434.
- Saito, M, Villanueva, SY, Chakraborty, A, Miyahara, S, Segawa, T, Asoh, T, *et al.* (2013). Comparative analysis of *Leptospira* strains isolated from environmental soil and water in the Philippines and Japan. *Appl Environ Microbiol*, 79(2), 601-609.
- Sandkvist, M. (2001). Type II Secretion and Pathogenesis. *Infect Immun*, 69(6), 3523-3535.
- Sanhueza, JM, Wilson, PR, Benschop, J, Collins-Emerson, JM, Heuer, C. (2018). Meta-analysis of the efficacy of *Leptospira* serovar Hardjo vaccines to prevent urinary shedding in cattle. *Prev Vet Med*, 153, 71-76.
- Savino, E, Rennella, E. (1954). Studies on *Leptospira*. XVII. Taxonomy of *Leptospira hyos* (new species) Savino and Renella 1944. *Dia Med*, 26(4), 109-110.
- Scharrig, E, Carestia, A, Ferrer, MF, Cédola, M, Pretre, G, Drut, R, *et al.* (2015). Neutrophil extracellular traps are involved in the innate immune response to infection with *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(7), 3927.
- Schijns, VEJC, Lavelle, EC. (2011). Trends in vaccine adjuvants. *Expert Rev Vaccines* 10(4), 539-550.
- Schreier, S, DOUNGCHAWEE, G, CHADSUTHI, S, TRIAMPO, D, TRIAMPO, W. (2013). Leptospirosis: current situation and trends of specific laboratory tests. *Expert Rev Clin Immunol*, 9(3), 263-280.
- Schüffner, W, Gispén, R, Bohlander, H. (1939). Voortgezette pogingen tot ordening der Leptospirae. *Geneesk Tijdschr Ned Ind*, 79, 2470-2478.

- Semskov, M. (1940). To the materials on etiology of infectious yellow fever of cattle. *Am J Trop Med*, 7, 71-95.
- Shang, ES, Summers, TA, Haake, DA. (1996). Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun*, 64(6), 2322-2330.
- Siegle, RL, Jennings, BR, Adams, PL, King, LP. (1980). Development of a model using polypeptide antibodies for scintigraphy of the pancreas. *Invest Radiol*, 15(5), 457-461.
- Smith, CR, Corney, BG, McGowan, MR, McClintock, CS, Ward, W, Ketterer, PJ. (1997). Amoxicillin as an alternative to dihydrostreptomycin sulphate for treating cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. *Aust Vet J*, 75(11), 818-821.
- Smyth, A, Fitzpatrick, D, Ellis, W. (1999). Stillbirth/perinatal weak calf syndrome: a study of calves infected with *Leptospira*. *Vet Rec*, 145(19), 539-542.
- Smythe, LD, Smith, IL, Smith, GA, Dohnt, MF, Symonds, ML, Barnett, LJ, *et al.* (2002). A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira spp.* *BMC Infect Dis*, 2(1), 1-7.
- Spickler, AR, Roth, JA. (2003). Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects. *J Vet Intern Med*, 17(3), 273-281.
- Srimanote, P, Wongdeethai, N, Jieanampunkul, P, Samonkiert, S, Leepiyasakulchai, C, Kalambaheti, T, *et al.* (2008). Recombinant *ligA* for leptospirosis diagnosis and *ligA* among the *Leptospira spp.* clinical isolates. *J Microbiol Methods*, 72(1), 73-81.
- Stevenson, B, Choy, HA, Pinne, M, Rotondi, ML, Miller, MC, DeMoll, E, *et al.* (2007). *Leptospira interrogans* Endostatin-Like Outer Membrane Proteins Bind Host Fibronectin, Laminin and Regulators of Complement. *PLoS One*, 2(11).
- Stimson, AM. (1907). Note on an organism found in yellow-fever tissue. *Public Health Rep*, 541-541.

- Stringfellow, DA, Brown, RR, Hanson, LE, Schnurrenberger, PR, Johnson, J. (1983). Can antibody responses in cattle vaccinated with a multivalent leptospiral bacterin interfere with serologic diagnosis of disease? *J Am Vet Med Assoc*, 182(2), 165-167.
- Stuart, RD. (1946). The preparation and use of a simple culture medium for leptospirae. *J Pathol Bacteriol*, 58(3), 343-349.
- Sulzer CR, WL, J. (1978). Leptospirosis: Methods in Laboratory Diagnosis. *US Department of Health, Education and Welfare; Centers for Disease Control, MD, USA*.
- Sun, A-H, Liu, X-X, Yan, J. (2020). Leptospirosis is an invasive infectious and systemic inflammatory disease. *Biomed J*, 43(1), 24-31.
- Swain, RHA. (1957). The electron-microscopical anatomy of *Leptospira Canicola*. *J Pathol*, 73(1), 155-158.
- Techawiwattanaboon, T, Barnier-Quer, C, Palaga, T, Jacquet, A, Collin, N, Sangjun, N, *et al.* (2020). A comparison of intramuscular and subcutaneous administration of LigA subunit vaccine adjuvanted with neutral liposomal formulation containing monophosphoryl lipid A and QS21. *Vaccines*, 8(3), 494.
- Teixeira, AF, Fernandes, LGV, Cavenague, MF, Takahashi, MB, Santos, JC, Passalia, FJ, *et al.* (2019). Adjuvanted leptospiral vaccines: Challenges and future development of new leptospirosis vaccines. *Vaccine*, 37(30), 3961-3973.
- Terpstra, WJ. (2003). *Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control*: World Health Organization.
- Terskikh, VI, Narcissov, N.V., Smirnov, M.R. . (1941). Vodnaya likhoradka vostochnykh rayonov v SSSR *Med Klin*, 19 (12) 59-68.
- Thaipadungpanit, J, Chierakul, W, Wuthiekanun, V, Limmathurotsakul, D, Amornchai, P, Boonslip, S, *et al.* (2011). Correction: 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(2).

- Thaipadunpanit, J, Chierakul, W, Wuthiekanun, V, Limmathurotsakul, D, Amornchai, P, Boonslip, S, *et al.* (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(1).
- Thiermann, AB. (1982). Experimental leptospiral infections in pregnant cattle with organisms of the Hebdomadis serogroup. *Am J Vet Res*, 43(5), 780-784.
- Turner, LH. (1970). Leptospirosis III: Maintenance, isolation and demonstration of leptospire. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 64(4), 623-646.
- Turner, LH. (1971a). Report (1962-1966) of the Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospira* to the International Committee on Nomenclature of Bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol*, 21(1), 140-141.
- Turner, LH. (1971b). Statements and Recommendations of the ICNB Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospira*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 21(1), 142-146.
- Uhlenhuth, P. (1915). Experimentelle Untersuchungen über die sogenannte Weilsche Krankheit (ansteckende Gelbsucht). *Med Klin*, 44, 1202-1203.
- Van Weemen, BK, Schuurs, A. (1971). Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett*, 15(3), 232-236.
- Varfolomeeva, AA. (1958). The properties and nomenclature of *L. perepelitsin*, a causative agent of benign leptospirosis. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*, 2(1), 50-56.
- Verma, A, Hellwage, J, Artiushin, S, Zipfel, PF, Kraiczy, P, Timoney, JF, *et al.* (2006). LfhA, a Novel Factor H-Binding Protein of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun*, 74(5), 2659-2666.
- Vincent, AT, Schiettekatte, O, Goarant, C, Neela, VK, Bernet, E, Thibeaux, R, *et al.* (2019). Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Negl Trop Dis*, 13(5).
- Vinh, T, Faine, S, Handley, CJ, Adler, B. (1994). Immunochemical studies of opsonic epitopes of the lipopolysaccharide of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 8(2), 99-107.

- Vinh, TU, Shi, M-H, Adler, B, Faine, S. (1989). Characterization and taxonomic significance of lipopolysaccharides of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *Microbiology*, 135(10), 2663-2673.
- Warthin, AS, Starry, AC. (1920). A more rapid and improved method of demonstrating spirochetes in tissues. *Am J Syph*, 4, 97-103.
- Weather-Spark. (2018-2019). Datos históricos meteorológicos de 2018-2019 en Tequisquiapan México. Retrieved from <https://es.weatherspark.com/h/y/6043/2018/Datos-hist%C3%B3ricos-meteorol%C3%B3gicos-de-2018-en-Tequisquiapan-M%C3%A9xico#Figures-Summary>
- Weil, A. (1886). Ueber eine eigenthümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende, acute Infectionskrankheit. *Dtsch Arco Klin Med*, 39, 209.
- Wilson-Welder, JH, Alt, DP, Nally, JE, Olsen, SC. (2021). Bovine Immune Response to Vaccination and Infection with *Leptospira borgpetersenii* Serovar Hardjo. *mSphere*, 6(2).
- Worthington, RW. (1982). Serology as an aid to diagnosis: uses and abuses. *N Z Vet J*, 30(7), 93-97.
- Wuthiekanun, V, Chierakul, W, Limmathurotsakul, D, Smythe, LD, Symonds, ML, Dohnt, MF, et al. (2007). Optimization of Culture of *Leptospira* from Humans with Leptospirosis. *J Clin Microbiol*, 45(4), 1363-1365.
- Yan, W, Faisal, SM, McDonough, SP, Chang, C-F, Pan, M-J, Akey, B, et al. (2010). Identification and characterization of OmpA-like proteins as novel vaccine candidates for Leptospirosis. *Vaccine*, 28(11), 2277-2283.
- Yang, CW, Wu, MS, Pan, MJ. (2001). Leptospirosis renal disease. *Nephrol Dial Transplant*, 16(suppl_5), 73-77.
- Yener, Z, Keles, H. (2001). Immunoperoxidase and histopathological examinations of leptospiral nephritis in cattle. *J Vet Med*, 48(7), 441-447.

- Zeng, L, Zhang, Y, Zhu, Y, Yin, H, Zhuang, X, Zhu, W, *et al.* (2013). Extracellular proteome analysis of *Leptospira interrogans* serovar Lai. *OMICS J Integr Biol*, 17(10), 527-535.
- Zuerner, RL. (2006). Laboratory maintenance of pathogenic *Leptospira*. *Curr Protoc Microbiol*(1), 12E-11.
- Zuerner, RL, Alt, DP, Palmer, MV, Thacker, TC, Olsen, SC. (2011). A *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo vaccine induces a Th1 response, activates NK cells, and reduces renal colonization. *Clin Vaccine Immunol*, 18(4), 684-691.

9. ANEXOS

Cuadro12. Secuencia del gen *gspD* y los fragmentos amplificados en la PCRa.

***gspD* GenBank: MT743253.1**

ATGTCCGGAACAATCAGTCAACTTTCAATCTTTAGAATATTCTCCCTTCTCATACTTTTGT TTTTAGTATGGGACAAACC
AGTCTTTCTCAAAGTAAGAAAAAACTTCCGCAAAGACAAAATCGGTTACTCAAGAAGAACCTTCGGAAAAAACTTTC
TATGCAAATTGGAGAGATACAGAACTAAACGACTTTCTCAAAGGAATGAGCGCCATTTTAAAGAAAAATATTCTTTTAG
ATGAAAGTTTAAAAGGTAAAAAATTACGATCATTCTCAAAGGAAATTCGGATCAAAAATGGATTTATCTTTATGAA
ATCTGTTTTAGAATCCCTAGGTTTCGGAGTAGTAGAAGAACCGGATCTCATTTCGATTGTTAAAATTAAGATGCGCCTT
GCTAGATCTCCTATCGTTAGGTCGGAAAAGAATTGATTCCCGAAGAGGAAGTTGGA **GATTATAGAACGATTACTCAG**G
TCATTCTATTGAAAATGTAACCAGAAGAATTAGAACCTATTTAAAACGCT **TACTTCTCCTAATACGG**ATGTGAT
CGTTTATAGAAATACAAATACGATTGTA CTTTCAGGTTCCGCCGAGACATCAATAAATGTTGGTACTTGTAAAGCGAA
TTTGACGTCAAATCGAAGAGGGGACTCCAGGATCGATTTTCATCGGCAGGTGATATTCAATTTATACTTTGGAATACA
GTGAGGCTGAAAAATCGCGGCGACTTTAGTTAAGTTAGACAATCCTGTGATTCAGTCTGAAGATCTGAGTTCTGAAAG
AAAGCCTCCACCGCCAGGGCAACCTATGCCTAAGGTAGATAAGATCAAGGCGGTTGGCCATAAAGAATCCAATTCGTGA
TTGTTACGGCGACAAATGCGGAATGGGCAGAAATCCGTAATAATCATTAAAGTTTTGGATTGAGCTAGAAAACAGGTTTT
ATTAGAAGTTTTGATCGTGGAACCTACTTCCAGCGATTTAAACGATTTCC **GGGATCGATTGGAGATATAA**GGGGGAAGCT
TTCGGTCAATTCAATTCTGGTCTTTCTAAAGAAGCGAATATTATCAATTCGAACGGTCAGGTCAATCCGAACATAAACAC
TCTGAGTGGTTTTCTTTTAGGATTTTTAAAAGCTGGTTCGGAACAAATCATAGGAATTTTAAAGCGCAATCAAGGAAAT
GAAAACTTAACTGTTATCTGCTCCTCAAGTGCTTACAGTAGATAATCAAGAAGCAGAAATCAGTGTGGGTCAAGACG
TGCCCGTTCGAACTCAGAGTAGGAACGCAGGTACTGGTGGAACGAACGCTGTAACCGTGGACAATTACGAATATCGTCTT
ACTGGTATCAAACCTAAGTTTACTCCTCACGTGAACAAAAATAATAAGATCACTCTCGAACTTTTCAGGAGATTA AAA
ATATCGCAGAGATTGCTCTCGCCGAGGAAACCTACTTTCAATCGAAGAGAAATTA AAACTTCTATCTCAATTGAAAA
CACTCAATCTATCGTGATCGGTGGATTGATTTGAAACGATAAACAAAAAGAATCATTAAAATTCCTTTTCTAGGAGAC
ATTCCGTATTTAGTGCATCTTTTAAAAGAACTACTGAAAAAATTA AAAAGACCAACTTGATGGTTTTTATTACGCCGC
ATATACTCGATAGTAGAGAGACT **GCGGATAAGATGACTGTT**AAGAAAAAATGCAGCAAGAACGTTACGAACTCGAGAG
AGAAAAGATCTCAACAAAGAAAGAGAAATCAGAGAAAAGAGGGGATTA

Iniciadores externos (1254 pb):

Adelantado externo

Reverso externo

Iniciadores internos (490 pb):

Adelantado interno

Reverso interno

Cuadro 13. Secuencia del gen *secY* de *L. interrogans* sv *Can* y los fragmentos amplificados en la PCRa (Basado en *cepa Hond Utrecht IV*).

***secY* Genbank:EU357961.1**

Leptospira interrogans* serovariedad *Canicola cepa Hond Utrecht IV

CCGGTTGTGGTTGCAGGAATCGGAATGATCCTTCTTCCGAAGGTCTTCTCGGAATGGTGGATCTTTTTGCAGGTGGAGC
TTTGTGAAATTCTCCATCTTCGCGCTTGAATCATGCCTTATATTTCTTCTCGATCGTAATGCAGCTTTTTATGGTCC
TTGTTCTGCCCTTCAAAAACCTTCAAAAAGAAGGAGAAGAAGGAAGAAAAAAATTTGGTCAATATACTAAGTATGGAAC
CGTAATCTTTGTGCGATTCAATCTTTAGCAGTGATCCAACCTCGCAAAGGGCTGGTCTACCGGCACGGAACCTTGAGCCTG
CGCGTTACCCGGGCTTAATCAATTCTCTGTTGTTCCCTTATTTTTATTTAATCGGAATCTTATCCATTACTACCGGAACCG
TTCTTCTCATTTGGTTAGGAGAACAGATCACCGAAAGAGGAATTTGGTAACGGAATTTCTCTTTTGATCTTCGCTGGAAT
TATCGGAAGACTGCCTGAGTCTATGGTTCACTTTTCTCTACCGATACGATGGATGCGTTGAATGTTCTTATCCTTTTGA
TCCTTTTATTCTTCTCATTTCTTGACGGTGTATTAACGCAAGGTGTGAGAAAGGTTCTCTGCAGTACGGAAAAACAAA
TGGTCGGAAGAAAAATGGTTCAGGCCAAGAGTCAATCTATTCTTTCAAAGTAAACGGTGCGAACGTG**ATGCCGATCAT**
TTTTGCTTCGTCTTTGATTTTATTTCTCAGACGATTATTCAATGGTTATCTAATAGTAGTCA**AAGAATGGGCTGGATGGG**
CAGTGATTATGGATTTTTTAAATCCATTCTCTCAGATTTGGTATCATGCGTTATTTTATTTTCGTAATTTATACCGCTTTA
ATTGTATTCTTTGCTTACTTCTATACAGCGATTCAAGTTAATCCTGCAGAATTTGGCTGAGAATTTGAAAAAATACGGTG
GATTCATTCCAGGAATTCGTCCGGTCTCACACAAAAGAATACATTGAAAAAGTGTAAATAGAATCACTCTCCCTGG
AGCTATGTTTCTTCAGGTTTGGCATTAGCACCTTATATTATAAAATTTCTTAGATTTGAGCTCTAACTCCGGTGGTG
GATCTTTGGTTTACATTTCGTGGAACCTTCTCTTAATTATGGTAG**GGGTTGCACTCGAGACTT**TAAAACAAATTTGAGTCT
CAACTTTAATGAGAAATTATGAAGCTTCAT**GAAGAAGTCTAAAATTAAGGGACGG**TCTTAATTTTTCCGTGAAGAAT
ATTATCTTCATGGGGCTCCTGGGGCTGAAAAAGGTACACAAGCAAAGATTTTGTGAGCGCTTTCTATTCTCAGAT
TTCTACAGGAGATATTTTACCGGAGGC

Iniciadores externos (549 pb):

Adelantado externo

Reverso externo

Iniciadores internos (Nº1: 402 pb, Nº2: 412 pb):

Adelantado interno Nº1

Adelantado interno Nº2

Reverso interno

Cuadro 14. Secuencia del gen *secY* de *L. interrogans* sv *Ict* y los fragmentos
amplificados en la PCRa (Basado en *cepa RGA*)

***secY* GenBank: EU357997.1**

***Leptospira interrogans* serovariedad *Icterohaemorrhagiae* cepa RGA**

TGTGGTTGCAGGAATTGCGAATGATCCTTCTTCCGAAGGACTTCTCGGAATGGTGGATCTTTTTGCTGGCGGAGCCTTGT
TGAATTTTTCCATTTTTCGCGCTTGAATCATGCCTTATATTTCTTCTCGATCGTAATGCAGCTTTTTATGGTCTTGT
CCTGCCCTTCAAAAACCTTCAAAAAGAAGGAGAAGAAGGAAGAAAAAATCGGTCAATATACTAAGTATGGAACCGTAA
TTCTTTGTGCGATTCAATCTTTAGCAGTGATCCAACCTCGCAAAGGGCTGGTCTACCGGCACGGAACCTGAGCCTGCGCGT
TACCCGGGCTTAATCAATTCTTCTGTTGTTCTTATTTTTATTTAATCGGAATCTTATCCACTACTACCGGAACCGTCT
TCTCATTTGGTTAGGAGAACAGATCACCGAAAGAGGAATTGGTAATGGAATTTCTTTTTGATCTTCGCTGGAATTATC
GGAAGACTGCCTGAGTCTATGGTTCAACTTTCTCTACCGATACGATGGATGCGTTGAATGTTCTTATCCTTTTGATTCT
TTTTATTCTTCTCATTTCCCTTGACGGTGTATTAACGCAAGGTGTGAGAAAAGTTCTCTCGAGTACGGAAAAACAAATGG
TCGGAAGAAAAATGGTTCAGGCCAAGAGTCAATCTATTTCTTTCAAAGTAAACGGCGCAACGTG**ATGCCGATCATTTT**
TGCTTCGTCTTTGATTTTATTTCTCAGACGATTATTCAATGGTTATCTAATAGTAGTC**AAGAATGGGCTGGATGGG**CA
GTGATTATGGATTTTTTAATCCATTCTCTCAGATTTGGTATCATGCGTTATTTATTTGTAATTTATACCGCTTTAAT
TGTATTCTTTGCTTACTTTTATACAGCGATTCAAGTTAATCCTGCAGAATTGGCTGAGAATTTGAAAAAATACGGTGGG
TTCATTCCAGGAATTCGTCCGGTCTCACACAAAAGAATACATTGAAAAAGTGTAAATAGAATCACTCTCCCGGAGC
TATGTTTCTTGACAGTTTGGCATTAGCACCTTATATTATAAAAATTTAGATTTGAGCTCTAACTCCGGCGGGTGGAA
TCTTTGGTTTATACATTCCGTGGAACCTTCTTCTAATTATGGTAG**GGTTGCACTCGAGACTT**TAAAACAAATTGAGTC
TCAACTTTAATGAGAAATTATGAAGGCTTCAT**GAAGAAGTCTAAAATTAAGGGACGG**TCTTAATTTTCCGTGAAGAA
TATTATCTTCATGGGGCTCCTGGGGCTGAAAAAGGTACACAAGCAAAGATTCTTTGTGAGCGCCTTTCTATTCTCAGA
TTTCTACAGGAGATTTTTACGCGAGGC

Iniciadores externos (549 pb):

Adelantado externo

Reverso externo

Iniciadores internos (N°1: 402 pb, N°2: 412 pb):

Adelantado interno N°1

Adelantado interno N°2

Reverso interno

Cuadro 15. Secuencia del gen *secY* de *L. santarosai* y los fragmentos amplificados en la PCRa (Basado en cepa **U83**).

***secY* GenBank: MH231557.1**

Leptospira santarosai* cepa **U83*

ATGCCGATCATTTTTTGCTTC**TT**CCTTGATCCTGTTCCACAGACGATCATT**CAGTGGTTGTCT****TCCAGCAGC**
GAACAGTGGGCGGGTTGGGCGATCATTATGGACTTTTTCAATCCATTCTCCCAAATCTGGTATCACGCATTG
TTTTACTTCGTGATCTATACTTCATTGATCGTGTCTTCGCATACTTTTACACTGCGATT**CAGTTCAACCCT**
GCGGAGTTGTCCGAGAACTTGA AAAAATACGGCGGGTTCATTCTGGAATTCGTCCCGGGTTCACACACGAA
AGAATACATCGAAAAGGTGTTAAACAGAATCACTCTTCCCGCGCGATGTTTCTCGCGGGATTGGCTCTGGC
TCCTTACATCATCATTAAATTCTAGATTTGAGCTCCAAC**CCGGTGGAGGATCTTTGGTTTATACGTTTGGT**
GGAACTCCCTTTTGATTATGGTAG**GGGTTGCACTCGAGACTT**TGAAACAAATCGAGTCTCAACTTTTAATG
AGAAATTATGAAGGCTTCAT**GAAGAAGTCTAAAATTAAGGGACCG**

Iniciadores externos (549 pb):

Adelantado externo

Reverso externo

Iniciadores internos (N°1: 402 pb, N°2: 412 pb):

Adelantado interno N°1

Adelantado interno N°2

Reverso interno

