



UNIVERSIDAD
SAN SEBASTIAN
VOCACIÓN POR LA EXCELENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA NATURALEZA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA
CARRERA MEDICINA VETERINARIA
SEDE LA PATAGONIA

**RELACIÓN ENTRE LA DETECCIÓN POR SEROLOGÍA Y LA REACCIÓN
DE POLIMERASA EN CADENA EN TIEMPO REAL DE LA INFECCIÓN
DE *LEPTOSPIRA* PATÓGENA EN HEMBRAS BOVINAS DE LA REGIÓN
DE LOS LAGOS**

PROYECTO DE MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIA

Profesor Tutor: Dra. Lucía Isabel Azócar Aedo

Copatrocinador: Dr. Alfredo Rodríguez Molina

Estudiante: Paz Belén Loebel Salgado

Puerto Montt, Chile

2024

© Paz Belén Loebel Salgado

Se autoriza la reproducción parcial o total de esta obra con fines académicos, por cualquier forma, medio o procedimiento, siempre y cuando se incluya la cita bibliográfica del documento.

Puerto Montt, Chile

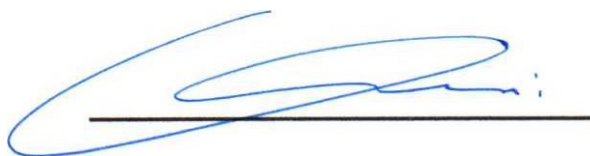
2024

HOJA DE CALIFICACIÓN

En Puerto Montt el 22 de julio de 2024, los abajo firmantes dejan constancia que el (la) estudiante Paz Belén Loebel Salgado de la carrera de Medicina Veterinaria ha aprobado su memoria de título para optar al grado de Médico Veterinario con una nota de 6,0



Dra. Lucía Azocar Aedo



Dr. Juan Pablo Pontigo



Dr. Daniel Medina

TABLA DE CONTENIDO

DERECHOS DE AUTOR.....	i
HOJA DE CALIFICACIÓN.....	ii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Aspectos generales de la leptospirosis.....	1
1.2 Pruebas diagnósticas.....	4
1.3 Leptospirosis en rumiantes.....	6
1.4 Epidemiología.....	6
1.5 Epidemiología en hembras bovinas en Chile.....	7
1.6 Aporte a la investigación.....	8
2. HIPÓTESIS.....	10
3. OBJETIVOS.....	11
3.1 Objetivo general.....	11
3.2 Objetivos específicos.....	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
4.1 Tipo de estudio.....	12
4.2 Área de estudio.....	12
4.3 Muestra de estudio.....	13
4.4 Criterios de inclusión y de exclusión.....	13
4.5 Recolección de muestras de sangre y orina.....	14
4.6 Pruebas diagnósticas.....	15
4.7 Análisis de datos.....	17
4.8 Presentación de los resultados del estudio.....	18
5. RESULTADOS.....	19
5.1 Existencia de hembras bovinas seropositivas a <i>Leptospira</i> patógena, los serovares/serogrupos reaccionantes y títulos de anticuerpos mediante la prueba MAT.....	19
5.2 Detección de hembras bovinas que presentaron eliminación renal de <i>Leptospira</i> patógena utilizando PCR en tiempo real.....	22

5.3 Relación entre animales seropositivos a la prueba MAT, con animales reaccionantes al PCR en tiempo real.....	23
5.4 Medidas de desempeño diagnósticas (sensibilidad y especificidad) para el PCR en tiempo real para la detección de <i>Leptospira</i> patógena, en relación a la prueba MAT	24
6. DISCUSIÓN	26
7. CONCLUSIONES.....	32
8. REFERENCIAS.....	33
9. ANEXOS	42
9.1 Anexo 1	42
9.2 Anexo 2	43
9.3 Anexo 3	44
9.4 Anexo 4	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación del género <i>Leptospira</i> según patogenicidad.....	2
Tabla 2. Serovares de <i>Leptospira</i> patógena que se utilizaron en la prueba MAT.....	15
Tabla 3. Resumen de las muestras seropositivas a <i>Leptospira</i> patógena con el serovar de mayor título. Región de Los Lagos, año 2024.	20
Tabla 4. Resumen de las muestras seropositivas a <i>Leptospira</i> patógena, especificando sus títulos de anticuerpos para cada serovar analizado con la prueba MAT. Región de Los Lagos, año 2024.	21
Tabla 5. Hembras bovinas positivas al PCR en tiempo real, detallando la cantidad de <i>Leptospira</i> por ml de orina. Región de Los Lagos, año 2024.	22
Tabla 6. Relación entre la seropositividad mediante la prueba MAT y positividad mediante PCR en tiempo real en hembras bovinas de la Región de los Lagos, año 2024.....	23
Tabla 7. Número de animales positivos y negativos a la prueba MAT y al PCR en tiempo real. Región de Los Lagos, año 2024.....	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Transmisión de la leptospirosis. Elaboración propia por L. Azócar-Aedo, (2023).	3
Figura 2. Reacciones de la prueba MAT. Elaboración por M. Céspedes, (2005).	5
Figura 3. Serovares obtenidos (%) en las muestras positivas a la prueba MAT en hembras bovinas de la Región de Los Lagos, año 2024.....	19
Figura 4. Frecuencia de presentación (%) de los títulos de anticuerpos frente a la seropositividad a <i>Leptospira</i> patógena mediante la prueba MAT en hembras bovinas de la Región de Los Lagos, año 2024.....	21
Figura 5. Relación entre la seropositividad identificada mediante la prueba MAT y la positividad mediante PCR en tiempo real en hembras bovinas de la Región de Los Lagos, 2024. Esta figura se hizo sin considerar el bovino 26, ya que es outlier.	24

RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica subdiagnosticada y de distribución mundial, que se presenta en regiones con climas húmedos; regiones tropicales, subtropicales y templadas. Puede afectar a animales domésticos, silvestres y también al ser humano. Es causada por una bacteria gram negativa perteneciente al género *Leptospira*, familia Leptospiraceae y orden Spirochaetales. Son delgadas, largas y en forma de espiral. Actualmente, el género *Leptospira* comprende 21 especies clasificadas en 3 grupos según su patogenicidad: saprófitas, patógenas e intermedias, siendo las especies patógenas causantes de la leptospirosis. Existen más de 300 serovares reconocidos según homología antigénica. Los hospedadores de mantención no se enferman y eliminan la bacteria al medio ambiente a través de la orina, mientras que los hospedadores accidentales que si desarrollan la enfermedad y presentan sintología clínica. En bovinos, esta enfermedad puede causar grandes impactos económicos debido a las alteraciones y fallas reproductivas que genera. En el sur de Chile, esta enfermedad cobra gran importancia puesto que representa una amenaza significativa para el rubro lechero y ganadero. Se realizó un estudio epidemiológico en la Región de Los Lagos, específicamente en un predio ubicado en la Comuna de Los Muermos y en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad San Sebastián, sede de la Patagonia, donde se muestrearon hembras bovinas con el objetivo de relacionar animales seropositivos a la prueba MAT, con animales reaccionantes al PCR en tiempo real. Los resultados evidenciaron una seropositividad del 39,3% mediante la prueba MAT. Además, se obtuvo una tasa de excreción renal de 29,5% mediante el PCR en tiempo real. Se determinó que 55 de 61 muestras coincidieron en el resultado de ambas pruebas diagnósticas, de las cuales 18 coincidieron en el resultado positivo y 37 coincidieron en el resultado negativo tanto para la prueba MAT como para el PCR en tiempo real. Se obtuvo una sensibilidad y especificidad del PCR en tiempo real en relación a la prueba MAT de 75% y 100% respectivamente. El PCR en tiempo real detecta a la bacteria a través de la orina, pudiendo determinar si existe contaminación ambiental y la magnitud de esta, mientras que la prueba MAT entrega los títulos de anticuerpos y los serovares/serogrupos causantes de la infección, permitiendo así conocer el origen de la enfermedad.

Palabras clave: *Leptospira*, zoonosis, bovino, orina, seropositividad.

ABSTRACT

Leptospirosis is an underdiagnosed zoonotic disease with worldwide distribution, which occurs in geographic areas with humid climates; as well as in tropical, subtropical and temperate regions. It can affect domestic and wild animals and also humans. It is caused by a gram-negative bacteria belonging to the genus *Leptospira*, family Leptospiraceae and order Spirochaetales. They are thin, long and spiral-shaped bacteria. Currently, the *Leptospira* genus includes 21 species classified into 3 groups according to their pathogenicity: saprophytic, pathogenic and intermediate, with the pathogenic species causing leptospirosis. There are more than 300 serovars recognized according to antigenic homology. Maintenance hosts do not get sick and eliminate the bacteria into the environment through urine, while accidental hosts do develop the disease and present clinical sinology. In cattle, this disease can cause great economic impacts due to the reproductive disorders and infertility. In the south of Chile, this disease is important since it represents a significant threat to the dairy and livestock sector. An epidemiological study was carried out in the Los Lagos Region, specifically in Los Muermos and the Veterinary Clinical Hospital at the San Sebastián University, campus Patagonia, where female bovines were sampled with the aim of relating seropositive animals to the Microscopic Agglutination Test (MAT), with animals reacting to real-time PCR. The results showed a seropositivity of 39.3% using the MAT test. Furthermore, a renal excretion rate of 29.5% was obtained by real-time PCR. It was calculated that 55 of 61 samples coincided in the result of both diagnostic tests, of which 18 coincided in the positive result and 37 coincided in the negative result for both the MAT test and the real-time PCR. A sensitivity and specificity of the real-time PCR in relation to the MAT test of 75% and 100%, respectively, were obtained. The real-time PCR detects the bacteria through urine, being able to determine if there is environmental contamination and its magnitude, while the MAT test provides the antibody titers and the serovars/serogroups causing the infection, thus allowing us to know the origin of the disease.

Keywords: *Leptospira*, zoonosis, bovine, urine, seropositivity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos generales de la leptospirosis

La leptospirosis es una enfermedad de relevancia que puede afectar la salud humana como también de animales domésticos y silvestres. Según Adler y de la Peña (2010) y Arent et al. (2022) la leptospirosis está presente en todos los continentes, a excepción de la Antártida, por lo que se considera una de las zoonosis más extendidas geográficamente en el mundo. Para Salgado et al. (2014) la leptospirosis se presenta mayoritariamente en áreas geográficas tropicales, subtropicales y templadas, debido a las condiciones climáticas y ambientales óptimas para el desarrollo de esta bacteria.

Gran parte de los mamíferos pueden ser portadores de la bacteria, donde la enfermedad y la presentación de signos clínicos pueden o no estar presentes. Se dice que los roedores son el reservorio principal que transmite la enfermedad a los humanos, por otro lado, también se cree que la transmisión dentro de rebaños de animales podrían ser un reservorio importante, sin embargo, el mantenimiento de la leptospirosis puede variar dependiendo de las zonas geográficas en donde se ubiquen los animales reservorios de esta enfermedad (Ko et al., 2009; Mwachui et al., 2015). La leptospirosis no solo puede causar problemas en la salud, sino que también es el origen de grandes pérdidas económicas en animales de producción, dado que la infección puede generar considerables impactos productivos y reproductivos en bovinos, ovinos y caprinos, así como también infecciones graves que pueden generar la muerte de los animales (Benavides-Romo y Marcillo-Arévalo, 2016; Martins y Lilenbaum, 2014; Salgado et al., 2014).

Esta enfermedad tiene como agente etiológico a una bacteria perteneciente al género *Leptospira*, familia Leptospiraceae y orden Spirochaetales. Son bacterias Gram negativas aerobias obligadas, delgadas y largas con forma de espiral, suelen medir 0,1 a 0,15 μm de grosor y 6 a 20 μm de largo (Azócar-Aedo, 2023). Levett (2001) indica que el microorganismo posee extremos que generalmente están doblados en forma de gancho, pudiendo tenerlos en uno o ambos extremos, además crecen en temperaturas entre 28-30°C y con un pH del medio de 7,2-7,6 (Monroy et al., 2020). Su motilidad está

dada por la presencia de un flagelo periplásmico, presente en su membrana externa, al igual que proteínas y lipopolisacáridos [LPS], siendo estos últimos de mayor importancia ya que constituyen el antígeno principal de *Leptospira* durante la infección. La virulencia, diversidad y clasificación de serogrupos está determinada por su LPS (López-Robles et al., 2021).

Según Torres-Castro et al. (2016) actualmente el género *Leptospira* comprende 21 especies clasificadas en tres clados según patogenicidad:

Tabla 1. Clasificación del género *Leptospira* según patogenicidad.

1. Especies saprófitas:	2. Especies patógenas:	3. Especies intermedias:
<i>L. biflexa</i>	<i>L. interrogans</i>	<i>L. inadai</i>
<i>L. wolbachii</i>	<i>L. kirschneri</i>	<i>L. broomii</i>
<i>L. meyeri</i>	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. fainei</i>
<i>L. vanthielii</i>	<i>L. santarosai</i>	<i>L. wolffii</i>
<i>L. terpstrae</i>	<i>L. noguchii</i>	<i>L. licerasiae</i>
<i>L. yanagawae</i>	<i>L. weilii</i>	
<i>L. idonii</i>	<i>L. alexanderi</i>	
	<i>L. kmetyi</i>	
	<i>L. alstoni</i>	

Fuente: elaboración propia, 2023.

De acuerdo con la clasificación anterior, Cilia et al. (2020) y Ko et al. (2009) indican que las especies saprófitas son un grupo de organismos que viven libremente en el agua y son inofensivas, mientras que las especies patógenas son causantes de la leptospirosis. Por otro lado, las especies intermedias son un grupo que contienen especies de patogenicidad poco clara. En la actualidad, hay más de 300 serovares reconocidos, todos distintos según sus diferencias antigénicas y organizados en 30 serogrupos por homología antigénica (Organización Mundial de Sanidad Animal [OMSA], 2021; Torres-Castro et al., 2023).

Según Adler y de la Peña (2010) la leptospirosis desde el punto de vista clínico se caracteriza por producir fiebre, insuficiencia renal y hepática, manifestaciones

pulmonares e insuficiencia reproductiva en diferentes mamíferos, incluyendo los humanos. Sin embargo, hay variabilidad en la sintomatología e incluso las infecciones suelen ser inaparentes; esto va a depender del serovar adaptado al huésped. Conforme con Cilia et al. (2020) y Levett (2001), existen huéspedes de mantenimiento y accidentales (Figura 1); los huéspedes de mantenimiento corresponden a aquellas especies donde la infección es endémica, es decir, mantienen la infección y además la transfieren por contacto directo por medio de la orina, debido a que son portadores renales asintomáticos. Por otro lado, los huéspedes accidentales son aquellos que se infectan incidentalmente comúnmente con orina infectada de los huéspedes de mantenimiento.

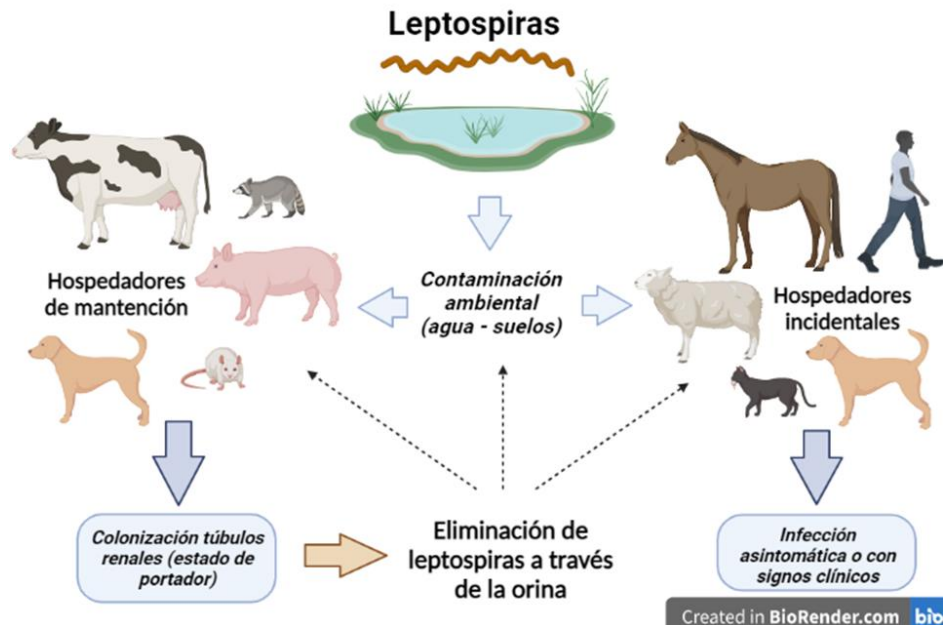


Figura 1. Transmisión de la leptospirosis. Elaboración propia por L. Azócar-Aedo, (2023).

Múltiples factores pueden influir en la transmisión de esta enfermedad, como el clima, el contacto de huéspedes de mantenimiento con huéspedes accidentales y la densidad poblacional (Céspedes, 2005). Según Haake y Levett (2015), la transmisión se puede dar por contacto directo con un animal infectado o por contacto indirecto con orina de animales infectados, así como también con aguas y suelos contaminados; ocurriendo con mayor frecuencia el contacto indirecto. También indican, que los cortes y abrasiones

en la piel, al igual que las membranas mucosas ya sea conjuntival, oral y genital, representan un punto importante para la entrada de *Leptospira* al organismo del huésped. Se ha descrito que la transmisión transplacentaria también puede ocurrir, mediante la transferencia de las leptospiras desde las madres a sus crías en el útero (Céspedes, 2005).

1.2 Pruebas diagnósticas

La gran mayoría de los animales que padecen esta enfermedad no presentan signos clínicos, es por esto, que las pruebas diagnósticas de laboratorio son de gran relevancia para comprobar el diagnóstico (García-Gonzales et al., 2013). Los métodos de diagnóstico están clasificados en dos grupos, el primero de ellos se basa en la detección de anticuerpos anti-*Leptospira*, mientras que el segundo utiliza líquidos o fluidos corporales o tejidos de animales para evidenciar la bacteria, antígenos o ácidos nucleicos de *Leptospira* (OMSA, 2021). Hoy en día, las pruebas serológicas son las más utilizadas para el diagnóstico de leptospirosis, siendo la Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT, acrónimo en inglés) la prueba de referencia debido a su alta especificidad, además con esta prueba se puede identificar el serovar o serogrupo de *Leptospira* presente en la infección (Céspedes, 2005). La prueba MAT consiste en mezclar una muestra de suero con diferentes diluciones que tienen antígenos seleccionados que incluyen cepas que representan los serogrupos existentes en una región en particular, para luego incubar la mezcla suero-antígeno y posteriormente observar con un microscopio de campo oscuro para detectar el grado de aglutinación y con ello determinar la concentración o título de la muestra, utilizando un punto de referencia de 50% de aglutinación (Haake y Levett, 2015) (Figura 2). La OMSA (2021) señala que muestras con títulos desde 1:100 se consideran como positivos, sin embargo, por la alta especificidad de la prueba, títulos menores pueden ser indicativos de una exposición previa a *Leptospira*. La prueba mencionada anteriormente constituye un diagnóstico fidedigno cuando la infección es aguda, mientras que en infecciones crónicas hay limitaciones, puesto que los títulos obtenidos se encuentran por debajo del mínimo aceptado para considerar la prueba como positiva.

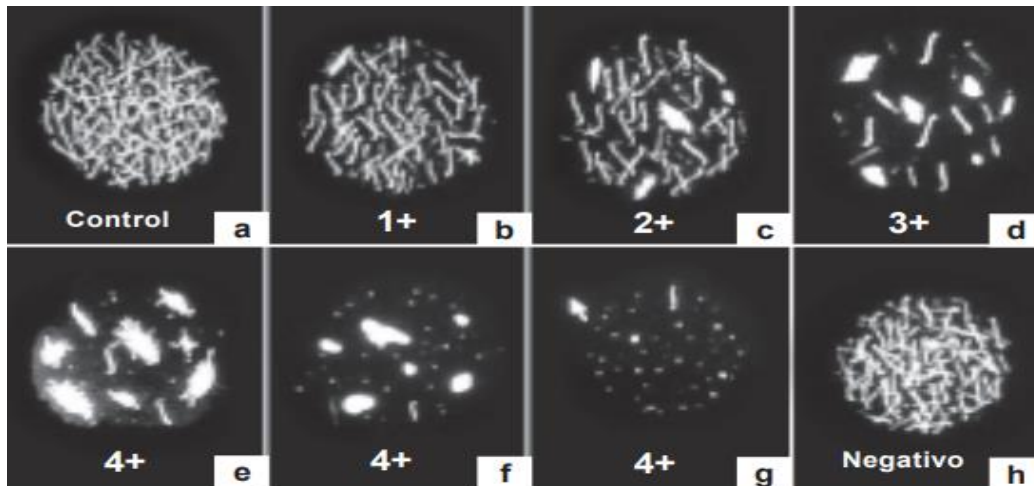


Figura 4. Reacciones de la prueba de aglutinación microscópica (MAT) **a:** lámina control; **b:** lámina con 25% de aglutinación (zonas como copos de algodón); **c:** lámina con 50% de aglutinación; **d:** lámina con 75% de aglutinación; **e:** lámina con 100% de aglutinación; **f:** lámina con 100% de aglutinación y lisis; **g:** lámina con 100% de lisis; **h:** lámina negativa.

Figura 2. Reacciones de la prueba MAT. Elaboración por M. Céspedes, (2005).

Por otro lado, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, acrónimo en inglés) corresponde a una prueba directa altamente sensible, que detecta secuencias nucleotídicas específicas del genoma bacteriano a partir de muestras de fluidos corporales como la orina, al igual que de tejidos infectados, es decir, identifica la bacteria (Calderón, 2023). Según Picardeau (2013), si se evidencia la presencia de *Leptospira* patógena en la muestra, el PCR es positivo. Una de las desventajas de esta prueba, es la contaminación con ADN de leptospiras exógenas, entregando falsos positivos referentes a las bacterias patógenas. Sin embargo, hay otra variedad de esta prueba, esta corresponde a PCR en tiempo real, la cual tiene mayor utilidad ya que es más confiable (Picardeau, 2013), puesto que permite medir la cantidad de ADN sintetizado en todo momento por la fluorescencia producida, la cual permite su lectura y es proporcional a la cantidad de ADN formado (Gibson, 2006). Además, según Kubista et al. (2006) el PCR en tiempo real tiene menor riesgo de contaminación, debido a que la fluorescencia es medida a través de un recipiente de reacción. Por consiguiente, el PCR en tiempo real

se está utilizando en mayor medida que la prueba de PCR convencional (Picardeau, 2013).

1.3 Leptospirosis en rumiantes

En animales de producción la leptospirosis puede causar grandes impactos económicos, debido a las pérdidas productivas en pequeños rumiantes (cabras y ovejas) como también en bovinos (Martin y Lilenbaum, 2014). En pequeños rumiantes comúnmente se asocian cepas pertenecientes al serovar Hardjo; incidentalmente los serovares/serogrupos involucrados son Pomona, Ballum, Icterohaemorrhagiae, y Grippotyphosa (Azócar-Aedo, 2023; León-Vizcaino, 1987). En cabras y ovejas, la leptospirosis en su forma aguda genera pirexia, depresión, ictericia, anorexia y síndromes anémicos y hemorrágicos; por otro lado, la forma crónica implica fallos reproductivos como abortos y muertes neonatales (Cortizo et al., 2015; Higinio et al., 2013).

En bovinos, la enfermedad en general se ha atribuido a los serovares Hardjo, Pomona, Canicola, Icterohaemorrhagiae y Grippotyphosa (Benavides-Romo y Marcilllo-Arévalo, 2016; Sykes et al., 2022). En leptospirosis aguda suele generar fiebre, anemia hemolítica, hematuria, hemoglobinuria, ictericia y meningitis (Alonso-Andicoberry et al., 2001; Sykes et al., 2022), mientras que en su presentación crónica produce alteraciones de tipo reproductivo, que involucran signos como infertilidad, mortinatos, abortos al último tercio de gestación y nacimiento de crías débiles (Benavides-Romo y Marcilllo-Arévalo, 2016).

1.4 Epidemiología

Se ha descrito en la literatura que la leptospirosis se presenta mayormente en regiones tropicales y subtropicales, esto se debe a que las condiciones climáticas y ambientales brindan la humedad y temperaturas óptimas para el desarrollo y sobrevivencia de esta bacteria. Es por ello, que Levett (2001) considera a la leptospirosis como una enfermedad estacional, que presenta una máxima incidencia en verano u otoño en las regiones anteriormente mencionadas. Sin embargo, Karpagam y Ganesh (2020) destacan que en

la actualidad la enfermedad también se detecta en regiones templadas, a causas de factores como el cambio climático y la migración humana. También señalan, que en países en desarrollo existen mayores probabilidades de exposición entre animales infectados con los humanos, debido a malas condiciones de higiene básica, eliminación inadecuada de la basuras y desechos y medidas deficientes de prevención y control.

En Chile, según el Ministerio de Salud (MINSAL, 2020) la leptospirosis es una enfermedad que requiere notificación obligatoria e inmediata en humanos desde el año 2002. De acuerdo con Azócar-Aedo (2023) existen estudios epidemiológicos sobre leptospirosis en varias especies animales. Principalmente llevados a cabo en el sur de Chile, en las regiones de La Araucanía, Los Ríos y Los Lagos. Aquellos estudios utilizaron en mayor medida pruebas diagnósticas serológicas, específicamente la prueba MAT. Algunas de las especies que más destacaron de estos estudios son los equinos, perros, cerdos y bovinos, debido a sus altas tasas de seroprevalencia, particularmente en bovinos. Sin embargo, la cantidad de estudios realizados en Chile no son suficientes, por lo que se requieren más estudios científicos para actualizar el conocimiento.

1.5 Epidemiología en hembras bovinas en Chile

La información en Chile sobre leptospirosis en bovinos es limitada, sin embargo, los estudios que existen han arrojado resultados de suma importancia con altas tasas de prevalencia.

En un estudio realizado por Salgado et al. (2014) se determinó la seroprevalencia utilizando MAT en un rebaño de bovinos lecheros de pequeños productores en el Sur de Chile, presentando un 75% de seroprevalencia, donde el serovar Hardjo fue el más reportado. También, en un estudio en vacas lecheras realizado en las regiones de Los Ríos y Los Lagos se obtuvo que un 47,3% de los animales resultaron positivos al PCR y un 13,4% seropositivos a la prueba MAT, destacando los serovares Ballum, Hardjo, Autumnalis y Pomona (Monti et al., 2023). Por otro lado, en una investigación realizada por Ojeda et al. (2018), se destacó la importancia de la transmisión de *Leptospira* patógena entre especies, específicamente, entre ganado de una explotación lechera ubicada en Lago Ranco, en la Región de Los Ríos y un gato habitante del mismo lugar,

teniendo como antecedente una prevalencia aparente de un 66% en el rebaño, la cual fue determinada con la prueba MAT, siendo los serovares Hardjo y Pomona los más frecuentes; en el gato se determinó la presencia de *Leptospira* patógena por medio de la prueba MAT y urocultivo con la posterior confirmación por PCR en tiempo real. Considerando que el gato vivía en contacto estrecho con el rebaño, se especuló que la fuente de infección provenía del ganado lechero.

Considerando los resultados anteriores y las consecuencias generadas por la leptospirosis en hembras bovinas en términos de trastornos del sistema reproductivo y las pérdidas económicas (Salgado et al., 2014), es relevante considerar medidas preventivas. A pesar de que la leptospirosis es una enfermedad de notificación obligatoria en humanos, según lo establecido en el Decreto Exento N° 389 (2014), la leptospirosis en Chile no es considerada en la lista de enfermedades de denuncia obligatoria en animales, no obstante, la normativa asociada a leptospirosis en animales podría cambiar dependiendo de los resultados de las futuras investigaciones (Azócar-Aedo, 2023).

1.6 Aporte a la investigación

La leptospirosis representa un problema para la salud pública en ámbitos de morbilidad y mortalidad (Pal et al., 2021) y genera grandes impactos económicos negativos en animales de producción debido a las alteraciones y fallas reproductivas que produce. Además, es importante en salud pública ya que es considerada como una zoonosis de riesgo laboral para aquellas personas que trabajan en la agricultura y en producción animal (Adler y de la Peña, 2010). Es por esto, que este estudio pretende determinar la prevalencia de leptospirosis en hembras bovinas atendidas en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad San Sebastián, sede de la Patagonia, Chile y en un plantel de hembras bovinas de leche ubicado en la comuna de Los Muermos, mediante las pruebas MAT y PCR en tiempo real y encontrar una relación entre ambas pruebas; con la prueba MAT identificando a los animales con anticuerpos anti-*Leptospira*, representando una exposición al agente si son títulos bajos de anticuerpos o una infección con títulos altos, y con PCR en tiempo real que identifica el ADN de la bacteria

y por ende determina la infección con *Leptospira* y también su eliminación por orina en animales infectados.

Por consiguiente, esta investigación pretende lograr ser una fuente actualizada de información sobre *Leptospira* patógena en los animales de este estudio. Además, de ser un aporte para el desarrollo de programas de prevención y control de la leptospirosis.

2. HIPÓTESIS

En el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad San Sebastián, sede de la Patagonia, Puerto Montt y en un predio de la región de Los Lagos, existen hembras bovinas seropositivas a *Leptospira* patógena y positivas al PCR en tiempo real, existiendo una coincidencia entre los resultados de ambas pruebas en los animales.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Realizar un estudio epidemiológico para detectar hembras bovinas seropositivas a *Leptospira* patógena mediante la prueba MAT y también animales que eliminen la bacteria a través de la orina identificados mediante PCR en tiempo real.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Establecer la existencia de hembras bovinas seropositivas a *Leptospira* patógena, los serovares/serogrupos reaccionantes y títulos de anticuerpos mediante la prueba MAT.
- 2) Detectar hembras bovinas que presenten la eliminación renal de *Leptospira* patógena utilizando PCR en tiempo real.
- 3) Relacionar animales seropositivos a la prueba MAT, con animales reaccionantes al PCR en tiempo real.
- 4) Determinar medidas de desempeño diagnósticas (sensibilidad y especificidad) para el PCR en tiempo real para la detección de *Leptospira* patógena, en relación a la prueba MAT.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Tipo de estudio

El presente estudio epidemiológico es observacional de tipo transversal, cuantitativo y descriptivo (Hernández et al., 2010).

4.2 Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad San Sebastián, sede de la Patagonia (área de animales mayores), ubicado en la ciudad de Puerto Montt, en la región de Los Lagos en el Sur de Chile. Puerto Montt está localizado en las coordenadas geográficas 41.4683° S y 72.9461° O, con una superficie de 1673.0 kilómetros cuadrados (Biblioteca del Congreso Nacional de Chile [BNC], 2020). Los pacientes del Hospital Clínico Veterinario pueden ser procedentes de zonas rurales como de localidades cercanas de la totalidad de la región de Los Lagos.

La otra área de estudio se llevó a cabo un predio ubicado en la comuna de Los Muermos, en la región de Los Lagos. Los Muermos está situado en las coordenadas geográficas 41.3945° S y 73.4649° O, con una superficie de 1245 kilómetros cuadrados (BCN, 2020). El plantel lechero está conformado por un rebaño de 58 hembras bovinas de la raza Holstein, con un sistema de crianza semi extensivo. Su alimentación es en base a pradera y ensilaje de pasto. Los partos son estacionales, y se concentran mayormente en primavera y en menor porcentaje en otoño.

Es importante mencionar que, a los encargados de los animales que ingresaron al Hospital Clínico Veterinario y al propietario del predio, se le entregó un consentimiento informado que explica el procedimiento de la extracción de muestras de sangre y la recolección de las muestras de orina. De igual manera, indica las pruebas diagnósticas a realizar y el objetivo de esta investigación. Este documento garantiza la autorización del Hospital Clínico Veterinario (Anexo 1) y del propietario (Anexo 2) para realizar los procedimientos anteriormente mencionados. Cabe destacar, que al propietario del predio se le informó acerca de los resultados obtenidos de las pruebas diagnósticas.

4.3 Muestra de estudio

La población de este estudio estuvo conformada por hembras rumiantes, de la especie de bovinos (*Bos Taurus*), que concurrieron al Hospital Clínico Veterinario o que pertenezcan al plantel lechero ubicado en la comuna de Los Muermos.

El tipo de muestreo fue probabilístico (Thursfield, 1990). Se muestrearon a todas las hembras bovinas que ingresaron al Hospital Clínico Veterinario y a todas las hembras bovinas pertenecientes al predio. Las muestras se tomaron teniendo presente que el estado de salud sea compatible con el procedimiento de recolección de muestras de sangre y orina, y que además no significara un deterioro de su condición clínica.

Se muestrearon a todas las hembras bovinas que ingresaron al Hospital Clínico Veterinario de la Universidad San Sebastián, sede de la Patagonia, en el período de recolección de muestras que contempló los meses desde diciembre del año 2023 a mayo del año 2024. El número total de animales fue de 3 hembras bovinas.

Por otro lado, se muestreó a toda la población de hembras bovinas pertenecientes al predio de la Comuna de Los Muermos, tomando en cuenta que el período de recolección de muestras se ejecutó en aproximadamente 6 meses, considerando los meses desde diciembre del año 2023 hasta mayo del año 2024. En total se muestrearon 58 animales.

Entonces, para este estudio se utilizaron un total de 61 hembras bovinas.

4.4 Criterios de inclusión y de exclusión

En esta investigación los criterios de inclusión implicaron a hembras rumiantes de la especie bovina (*Bos taurus*) con edades entre los 2 y 10 años, con un estado clínico y fisiológico apto y compatible con la toma de muestras de sangre y orina, además, que sean atendidas en Hospital Clínico Veterinario de la Universidad San Sebastián, sede de la Patagonia o bien que sean pertenecientes al predio de la comuna de Los Muermos.

Por otro lado, los criterios de exclusión consideraron animales no rumiantes, machos, ovinos y caprinos y que su estado clínico y de salud sea incompatible con la toma de muestras o que resulte perjudicial para su salud y bienestar. También, se excluyeron las

hembras bovinas menores de 2 o mayores de 10 años, además, se excluyeron a los animales que no contaron con su Dispositivo de Identificación Individual Oficial (DIIO).

Sólo se muestrearon hembras bovinas, dado que el procedimiento de recolección de muestras de orina es aplicable de buena manera, sin ser invasivo ni generar estrés en los animales, al contrario de lo que ocurre con la toma de estas muestras en rumiantes ovinos y caprinos, tanto en machos como en hembras. Además, se muestrearon hembras bovinas con edad entre 2 a 10 años, puesto que, en ese rango de edad la leptospirosis cobra mayor relevancia debido a la posible presentación de abortos. Esto se debe a que, generalmente, desde los 24 meses en adelante comienza la primera parición (Ferreira et al., 2010).

4.5 Recolección de muestras de sangre y orina

Para la obtención de las muestras de sangre se utilizó como acceso venoso la vena yugular, previamente desinfectado con alcohol 70°. Para la venopunción se utilizaron jeringas de 5 ml o 10 ml y agujas de 18G o 21G, extrayendo un volumen de sangre de aproximadamente 1 ml. Cada muestra se distribuyó en un tubo rotulado sin anticoagulante y se mantuvo entre 4-6 °C por 24-48 horas, luego fue centrifugado a 2.500 rpm en un tiempo de 5 minutos para obtener el suero, que fue depositado en un tubo Eppendorf rotulado y se almacenó a -20 °C. Posteriormente, las muestras fueron trasladadas por la docente guía del presente estudio hacia el laboratorio de enfermedades infecciosas del Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, para su análisis. Las muestras se transportaron en una caja criogénica dentro de un cooler, rodeado de gel pack para mantener la temperatura de congelación de las muestras.

Para la obtención de la muestra de orina, se realizó una limpieza de la zona perineal con agua y jabón, con enjuague y secado previo al muestreo. La inducción de la micción se realizó mediante un masaje de la zona perineal con el dorso de la mano (Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud [OPS y OMS], 2017). El volumen de orina mínimo a obtener fue de 20 ml, el cual se recolectó en un frasco de orina de plástico estéril con tapa rosca rotulado y luego se almacenó entre 4-6 °C por un

máximo de tiempo de 4 días, para ser llevado al laboratorio antes mencionado de la Universidad Austral de Chile en Valdivia para su análisis. Las muestras se trasladaron en una caja criogénica dentro de un cooler, rodeado de gel pack.

Es relevante señalar que, para la obtención de muestras de sangre y orina, se utilizaron métodos de sujeción de tipo físico para los animales, es decir, se emplearon cuerdas o lazos para su inmovilización y recolección de las muestras. Cuando no se consideró seguro el uso de cuerdas debido al tamaño, temperamento y comportamiento del animal, se utilizaron bretes y mangas, debido a que son técnicas que brindan mayor seguridad tanto para los animales como para las personas, además, facilitan el manejo, disminuyen los niveles de estrés, mejorando el bienestar animal y se minimiza la mano de obra (Ceva, 2022).

4.6 Pruebas diagnósticas

Se realizó la prueba MAT en cada muestra de suero obtenida, para determinar la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira* y se identificó el serogrupo y serovar causante de la seropositividad. Según World Health Organization y International Leptospirosis Society (WHO-ILS, 2003) la prueba consta de dos fases (Anexo 3), en la primera de ellas se mezcla el suero problema con un cultivo de *Leptospira*, para luego evaluar el grado de aglutinación utilizando un microscopio de campo oscuro; se considera un 50% de aglutinación como punto de referencia. En la fase dos, se determinarán los títulos de anticuerpos y el serovar/serogrupo implicado.

Para esta investigación se utilizó un protocolo que considera títulos de 1:100, 1:200, 1:400 1:800 y 1:1600, donde títulos desde 1:100 representan seropositividad a *Leptospira* spp. (WHO y ILS, 2003); en los casos donde una muestra reaccionó a más de un serovar con títulos idénticos de anticuerpos se catalogó como coaglutinación, por lo que no se le atribuyó ningún serovar (Silva y Riedemann, 2007). Se emplearon 8 serovares señalados a continuación (Tabla 2):

Tabla 2. Serovares de *Leptospira* patógena que se utilizaron en la prueba MAT.

Serovares de <i>Leptospira</i> patógena utilizados en la prueba MAT			
Hardjo	Pomona	Canicola	Tarassovi
Icterohaemorrhagiae	Autumnalis	Bratislava	Grippotyphosa

Fuente: elaboración propia, 2023.

Por otra parte, cada muestra de orina se sometió a la extracción y purificación de ADN por medio de un kit comercial, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cabe mencionar que el nombre del kit no se menciona, ya que la información fue de carácter confidencial. El laboratorio emplea dos formas de control de calidad de las muestras de ADN. La primera es la medición de la concentración de ADN expresada en ng/ml y la segunda es la relación de absorbancia a 260 y 280 nanómetros (A260/A280) que mide la pureza del ADN extraído y, además, a partir de esta relación se puede determinar si existe contaminación con proteínas o químicos; la relación A260/A280 óptima tiene un valor entre 1,8 - 2,0. Ambos controles se realizaron por medio de un espectrofotómetro de acuerdo a la capacidad de absorbancia a una longitud de onda determinada (Banco Nacional de ADN Carlos III, 2024) (Anexo 4). Posteriormente, el ADN purificado se utilizó para efectuar PCR en tiempo real utilizando una sonda TaqMan dirigida al gen leptospiral lipI32 (Stoddard et al., 2009). El mix de amplificación para cada muestra incluyó las especificaciones descritas por Stoddard et al. (2009) y Salgado et al. (2015). Para la amplificación se consideró una temperatura de 95 °C durante 2 minutos para la desnaturalización inicial, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 5 segundos y elongación durante 30 segundos a 58 °C (Salgado et al., 2015, Stoddard et al., 2009). El control positivo para la extracción de ADN y el PCR fue un cultivo puro de *Leptospira* patógena en dos diluciones con una concentración conocida de las bacterias (Monti et al., 2023).

El PCR en tiempo real permite cuantificar la cantidad de ADN bacteriano presente en cada muestra de orina, es decir, mide la cantidad de leptospiras por ml de orina, siendo un indicador de la carga bacteriana presente en las muestras (Tamay de Dios et al., 2013).

4.7 Análisis de datos

La seropositividad se determinó con la siguiente fórmula (modificada) (Dohoo et al., 2003):

Seropositividad = Número de individuos positivos a la prueba MAT/ Número de individuos sometidos a la prueba diagnóstica MAT

Por otra parte, la positividad en la orina (tasa de excreción renal) se calculó con la fórmula:

Positividad = Número de individuos positivos al PCR en tiempo real/ Número de individuos sometidos al PCR en tiempo real

Adicionalmente se calcularon intervalos de confianza del 95% (IC 95%) para la seropositividad y positividad en orina con la siguiente fórmula (Noordhuizen et al., 2017):

Positividad $\mp 1.96 * \sqrt{[(\text{Positividad} * (1 - \text{Positividad})) / \text{Tamaño muestral}]}$

Para los análisis estadísticos se utilizó la prueba de Chi-cuadrado con corrección de Yates para comparar proporciones, considerando un valor p menor a 0,05 como significancia estadística (Hazra y Gogtay, 2016). Esta prueba se llevó a cabo mediante las aplicaciones del programa EpiInfo versión 6.04.

La relación entre los resultados de la seropositividad/serología de la prueba MAT y los resultados del PCR en tiempo real, se determinaron por medio del recuento (frecuencia absoluta) de los animales que resulten positivos a ambas pruebas diagnósticas al mismo tiempo.

La determinación de las medidas de desempeño diagnóstica (sensibilidad y especificidad) del PCR en tiempo real en relación con la prueba MAT, se efectuaron por medio de Win Epi (De Blas et al., 2006) con tablas de contingencia (o tablas de 2 x 2). De acuerdo con Salazar (2017), la sensibilidad se define como la proporción de individuos enfermos que poseen una prueba positiva, mientras que la especificidad corresponde a la proporción de individuos sin la enfermedad y que poseen una prueba negativa, y se calcularon con las siguientes fórmulas:

Sensibilidad = Verdaderos positivos/ Verdaderos positivos + Falsos negativos

Especificidad = Verdaderos negativos/ Falsos positivos + Verdaderos negativos

4.8 Presentación de los resultados del estudio

Los resultados de esta investigación se presentaron por medio tablas y figuras (gráficos) que describen la seroprevalencia (seropositividad), los serovares/serogrupos y títulos de anticuerpos anti-*Leptospira* en base a frecuencias absolutas y frecuencias relativas (porcentajes), también se incluyeron aquellos animales positivos al PCR en tiempo real. Además, estas tablas contienen el número total de animales muestreados, número total de animales seropositivos a la prueba MAT indicando la cantidad de títulos de anticuerpos obtenidos por cada animal, el serovar/serogrupo reaccionante.

También se construyó una tabla que describe la sensibilidad y especificidad del PCR en tiempo real en relación con la prueba MAT.

5. RESULTADOS

5.1 Existencia de hembras bovinas seropositivas a *Leptospira* patógena, los serovares/serogrupos reaccionantes y títulos de anticuerpos mediante la prueba MAT

Se obtuvieron un total de 61 muestras de hembras bovinas, de las cuales 3 pertenecieron a la Universidad San Sebastián sede de la Patagonia y 58 pertenecieron a un predio ubicado en la Comuna de Los Muermos.

Mediante la prueba MAT, se encontraron títulos de anticuerpos anti-*Leptospira* en 24 hembras bovinas, todas pertenecientes al predio en donde se realizó esta investigación, lo que corresponde a una seropositividad de 39,3% (IC 95% = 27,04% - 51,57%). Además, en las muestras positivas se encontró seropositividad para todos los serovares estudiados (Figura 3). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las proporciones de serovares ($p > 0,05$).

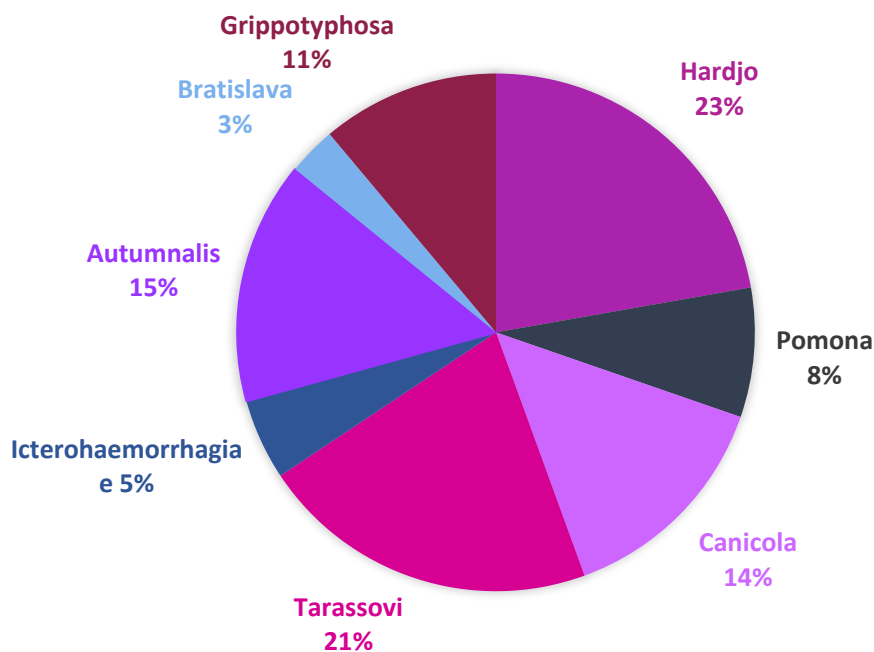


Figura 3. Serovares obtenidos (%) en las muestras positivas a la prueba MAT en hembras bovinas de la Región de Los Lagos, año 2024.

Fuente: elaboración propia, 2024.

Se destacó la reactividad al serovar Hardjo siendo responsable de la seroreactividad de 13 de los 24 seropositivos y Tarassovi responsable de 10 de los 24 seropositivos (Tabla

3). También, se obtuvo una muestra que presentó coaglutinación para el serovar Hardjo y Tarassovi, es decir, presentó reacciones a diferentes serovares con títulos idénticos de anticuerpos.

Tabla 3. Resumen de las muestras seropositivas a *Leptospira* patógena con el serovar de mayor título. Región de Los Lagos, año 2024.

Número de muestra	Serovar y título de anticuerpos
4	Tarassovi 1:200
8	Hardjo 1:200
11	Tarassovi 1:200
13	Hardjo 1:400
15	Tarassovi 1:800
20	Tarassovi 1:400
22	Hardjo 1:800
24	Hardjo 1:400
25	Hardjo 1:800
26	Tarassovi 1:1600
31	Hardjo 1:400
33	Hardjo 1:800
34	Hardjo 1:1600
36	Hardjo 1:200
39	Hardjo/Tarassovi 1:200
43	Tarassovi 1:800
47	Hardjo 1:200
48	Hardjo 1:400
49	Tarassovi 1:200
51	Tarassovi 1:400
52	Tarassovi 1:800
54	Hardjo 1:200
56	Hardjo 1:800
60	Tarassovi 1:800

Fuente: elaboración propia, 2024.

En relación con los títulos de anticuerpos responsables de la seroreactividad, los títulos más comunes fueron 1:800 y 1:200, cada uno con un total de 8 muestras (33,3%). Le siguieron los títulos de 1:400, con 6 muestras (25%), y 1:1600, con 2 muestras (8,3%) (Figura 4). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las proporciones de títulos de anticuerpos ($p > 0,05$).

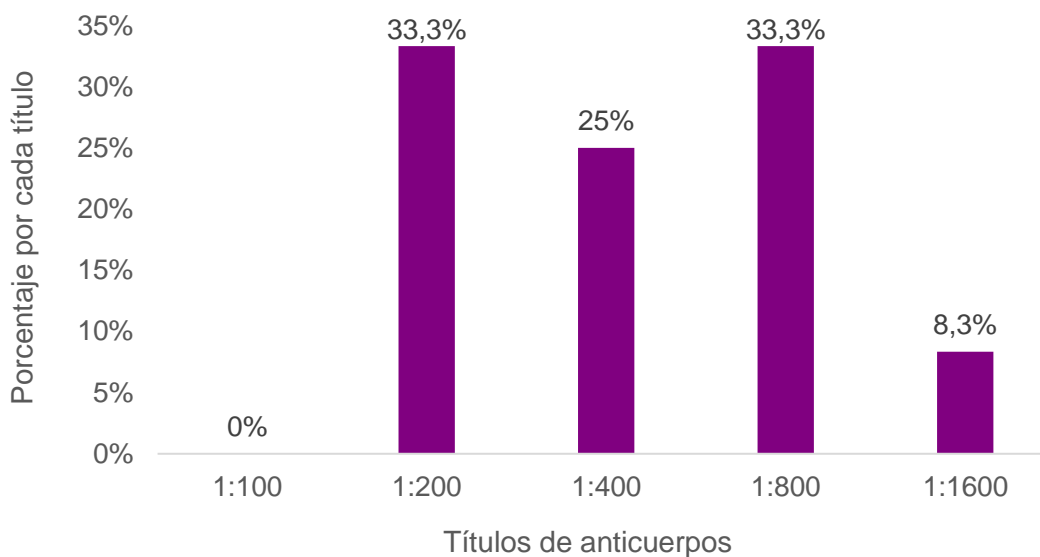


Figura 4. Frecuencia de presentación (%) de los títulos de anticuerpos frente a la seropositividad a *Leptospira* patógena mediante la prueba MAT en hembras bovinas de la Región de Los Lagos, año 2024.

Fuente: elaboración propia, 2024.

Con respecto a los títulos de anticuerpos frente a los serovares estudiados, el más bajo fue de 1:100 y el máximo obtenido fue de 1:1600 el cual se presentó en 2 muestras de las positivas (Tabla 4).

Tabla 4. Resumen de las muestras seropositivas a *Leptospira* patógena, especificando sus títulos de anticuerpos para cada serovar analizado con la prueba MAT. Región de Los Lagos, año 2024.

Número de muestra	H	P	C	T	I	A	B	G
4				200		100		
8	200			100				
11	100		100	200				100
13	400		100	200		100		200
15	200			800	100			
20	100			400	100			100
22	800	100		400	100	200		200
24	400		100			200		
25	800	200	100	200				100
26	400		200	1600	200	100	100	
31	400		200			100		
33	800	100	100	400				400
34	1600		200	400	200	400	100	
36	200		100	100				

39	200			200	100	
43	400	100	100	800	200	400
47	200		100		100	
48	400			200	100	100
49	100			200		
51	200	100		400	100	
52		100	200	800	400	200
54	200		100	100		100
56	800	100	200	400	100	200
60	400	200		800	400	200

H indica Hardjo; P, Pomona; C, Canicola; T, Tarassovi; I, Icterohaemorrhagiae; A, Autumnalis; B, Bratislava; G, Grippotyphosa.

Fuente: elaboración propia, 2024.

5.2 Detección de hembras bovinas que presentaron eliminación renal de *Leptospira* patógena utilizando PCR en tiempo real

De un total de 61 muestras obtenidas, 18 resultaron positivas al PCR en tiempo real (Tabla 5), lo que indica una positividad o tasa de excreción renal de 29,5% (IC 95 = 18,05% - 40,94%). Todas las muestras positivas provienen de las hembras bovinas pertenecientes al predio donde se realizó el estudio.

En la cuantificación de *Leptospira*/ml de orina se obtuvieron resultados variables en cuanto a cantidad, siendo el valor mínimo 1,07 y los valores máximos 145 y 12.500.

Tabla 5. Hembras bovinas positivas al PCR en tiempo real, detallando la cantidad de *Leptospira* por ml de orina. Región de Los Lagos, año 2024.

Número de muestra	qPCR	Crossing point	<i>Leptospira</i> /ml
13	(+) Positivo	35,3	14,2
15	(+) Positivo	36,52	5,04
20	(+) Positivo	36,44	5,41
22	(+) Positivo	35,8	9,29
24	(+) Positivo	33,26	80,9
25	(+) Positivo	33,31	77,1
26	(+) Positivo	27,33	12.500
31	(+) Positivo	35,88	8,66
33	(+) Positivo	35,96	8,13
34	(+) Positivo	37,27	2,66
36	(+) Positivo	35,93	7,35
43	(+) Positivo	36,85	3,8

48	(+) Positivo	32,58	145
49	(+) Positivo	36,8	3,99
51	(+) Positivo	37,11	3,04
52	(+) Positivo	37,27	2,66
56	(+) Positivo	39,09	1,07
60	(+) Positivo	36,00	8,02

Fuente: elaboración propia, 2024.

5.3 Relación entre animales seropositivos a la prueba MAT, con animales reaccionantes al PCR en tiempo real

Las hembras bovinas seropositivas a la prueba MAT fueron un total de 24, mientras que las reaccionantes al PCR en tiempo real fueron 18, de las cuales 18 muestras coincidieron en el resultado positivo de ambas pruebas diagnósticas; solo 6 muestras no coincidieron en el resultado positivo para las dos pruebas evaluadas, ya que se obtuvo resultado positivo solo para la prueba MAT y negativo para el PCR en tiempo real (Tabla 6) (Figura 5).

Tabla 6. Relación entre la seropositividad mediante la prueba MAT y positividad mediante PCR en tiempo real en hembras bovinas de la Región de los Lagos, año 2024.

Número de muestra	Positivas a la prueba MAT	Positivas al PCR en tiempo real
4	(+) Positivo	(-) Negativo
8	(+) Positivo	(-) Negativo
11	(+) Positivo	(-) Negativo
13	(+) Positivo	(+) Positivo
15	(+) Positivo	(+) Positivo
20	(+) Positivo	(+) Positivo
22	(+) Positivo	(+) Positivo
24	(+) Positivo	(+) Positivo
25	(+) Positivo	(+) Positivo
26	(+) Positivo	(+) Positivo
31	(+) Positivo	(+) Positivo
33	(+) Positivo	(+) Positivo
34	(+) Positivo	(+) Positivo
36	(+) Positivo	(+) Positivo
39	(+) Positivo	(-) Negativo
43	(+) Positivo	(+) Positivo

47	(+) Positivo	(-) Negativo
48	(+) Positivo	(+) Positivo
49	(+) Positivo	(+) Positivo
51	(+) Positivo	(+) Positivo
52	(+) Positivo	(+) Positivo
54	(+) Positivo	(-) Negativo
56	(+) Positivo	(+) Positivo
60	(+) Positivo	(+) Positivo

Fuente: elaboración propia, 2024.

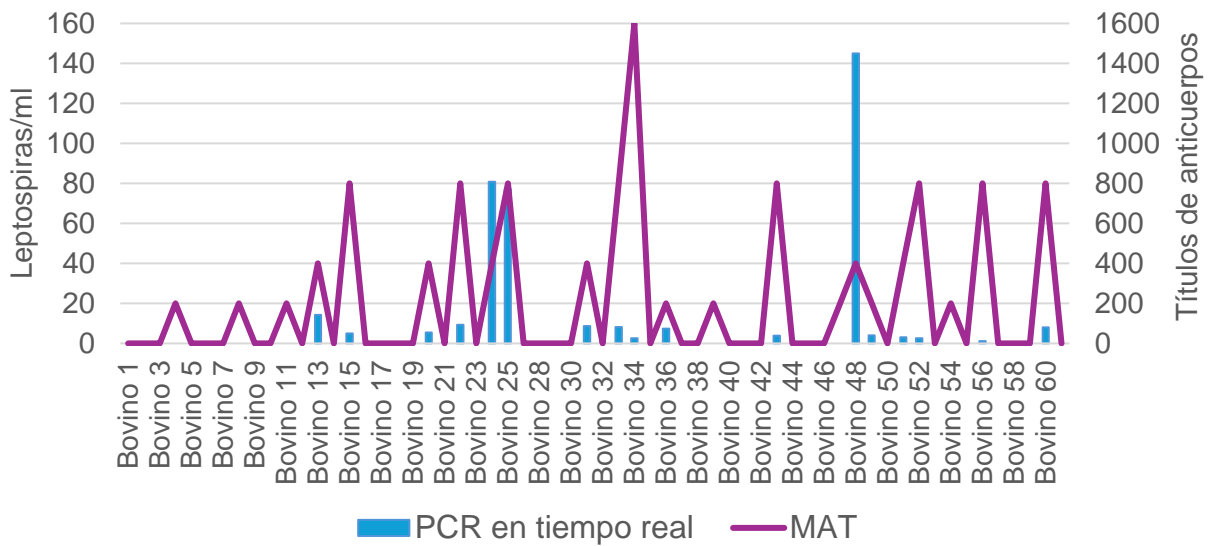


Figura 5. Relación entre la seropositividad identificada mediante la prueba MAT y la positividad mediante PCR en tiempo real en hembras bovinas de la Región de Los Lagos, 2024. Esta figura se hizo sin considerar el bovino 26, ya que es outlier.

Fuente: elaboración propia, 2024.

5.4 Medidas de desempeño diagnósticas (sensibilidad y especificidad) para el PCR en tiempo real para la detección de *Leptospira* patógena, en relación a la prueba MAT

Con un nivel de confianza de 95%, el PCR en tiempo real tiene una sensibilidad de 75% (IC 95% = 57,7% - 92,3%) y una especificidad de 100% en relación a la prueba MAT, que es la prueba estándar de oro para el diagnóstico de leptospirosis (Tabla 7).

Tabla 7. Número de animales positivos y negativos a la prueba MAT y al PCR en tiempo real. Región de Los Lagos, año 2024.

		Prueba MAT	
		Positivos	Negativos
PCR tiempo real	Positivos	18	0
	Negativos	6	37

Fuente: elaboración propia, 2024.

6. DISCUSIÓN

En el presente estudio se muestrearon 61 hembras bovinas de un predio en la comuna de Los Muermos y del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad San Sebastián, sede Patagonia, en Puerto Montt. Las muestras se recolectaron durante un periodo de 6 meses, desde diciembre de 2023 hasta mayo de 2024, con el objetivo de detectar hembras bovinas seropositivas a *Leptospira* patógena mediante la prueba MAT y animales que eliminan la bacteria a través de la orina, identificados mediante PCR en tiempo real.

Se determinó una seropositividad de 39,3% del total de animales muestreados, utilizando la prueba MAT. Además, se obtuvo una tasa de excreción renal de 29,5% mediante el PCR en tiempo real. Por otro lado, del total de animales muestreados, 18 coincidieron en el resultado positivo de ambas pruebas diagnósticas. Se obtuvo una sensibilidad y especificidad del PCR en tiempo real en relación a la prueba MAT de 75% y 100% respectivamente.

La seroprevalencia de *Leptospira* patógena reportada en otros países oscila entre 41% y 89,9%. Por ejemplo, en México se reporta una seropositividad de 86,6% (Gutiérrez et al., 2021), Colombia 41% (Betancur et al., 2013), Ecuador 57,38% (Macias et al., 2019), mientras que, en Brasil se reportó una seropositividad de 47,3% (Orsi et al., 2022). Además, según Aqib et al. (2019), en países como India y Polonia, la seropositividad es aún mayor, alcanzando porcentajes de 87% y 89,9% respectivamente. Conforme con las seroprevalencias reportadas en otros países, los resultados obtenidos en el presente estudio son menores. Esta diferencia puede deberse a que en los otros países existen otras condiciones climáticas que favorecen el desarrollo de la enfermedad, además, existe mayor cantidad de animales y, por ende, mayor probabilidad de exposición entre animales infectados (Alonso-Andicoberry et al., 2001). También, es relevante tener en cuenta que en los estudios de Gutiérrez et al. (2021) y Betancur et al. (2013) muestrearon a bovinos con trastornos reproductivos y en la investigación de Orsi et al. (2022) se utilizaron muestras de bovinos de matadero. Estas condiciones podrían influir en la

seropositividad, entregando resultados más elevados en comparación de los obtenidos en el presente estudio.

Por otra parte, en un estudio realizado en bovinos en el sur de Chile por Zamora et al. (1975), se determinó una seropositividad de 59,15%. En otro estudio realizado en una planta faenadora de carnes en la ciudad de Valdivia en el año 1991 se detectó una seropositividad de 44,9% (Zamora et al., 1991). También en un estudio realizado en rebaños de bovinos lecheros en el sur de Chile se obtuvo una seropositividad de 75% (Salgado et al., 2014). Se determinó una seropositividad de 66% en una explotación lechera de la región de Los Ríos (Ojeda et al., 2018). Un estudio más reciente realizado en las regiones de Los Ríos y Los Lagos por Monti et al. (2023), se encontró una seropositividad de 13,4%. Por consiguiente, a pesar de que los estudios fueron realizados en Chile, la seropositividad reportada en esas investigaciones es diferente de la encontrada en este estudio. Esta alta variabilidad de resultados entre estudios es probable que se deba a la carga bacteriana ambiental existente en los diferentes lugares donde se realizaron los estudios. Si bien, todas las investigaciones se llevaron a cabo en la zona sur de Chile, se desconoce los manejos ambientales y de rebaño que se tenían en cada predio, como por ejemplo, el control de plagas, los cercados para evitar el contacto con otros bovinos de diferentes predios o con fauna silvestre, o bien la vacunación contra la enfermedad; lo mismo ocurre con el estudio realizado en la planta faenadora de carnes, donde no se tienen mayores antecedentes de la procedencia de los animales. También, la respuesta inmune de los animales podría ser diferente, ya sea por su estado de salud general o por la inmunización por la vacuna contra leptospirosis.

Se encontró seropositividad frente a los 8 serovares estudiados, siendo los más frecuentes Hardjo con un 23%, seguido de Tarassovi con un 21%. Posteriormente, le sigue el serovar Autumnalis (15%), Canicola (14%), Grippotyphosa (11%), Pomona (8%), Icterohaemorrhagiae (5%) y Bratislava (3%).

En Chile, según Zamora et al. (1991), en su investigación el serovar más predominante correspondió a Hardjo (67,9%), seguido de Pomona (11,7%) y Tarassovi (8,6%). En el estudio de Salgado et al. (2014), el serovar reportado con mayor frecuencia correspondió a Hardjo (81%), al igual que en la investigación de Ojeda et al. (2018), donde el serovar

más frecuente fue Hardjo, seguido de Pomona. Sin embargo, en el estudio Zamora et al. (1975), Pomona fue el serovar más destacado, mientras que en el trabajo de Monti et al. (2021), se reportó que el serovar más reactivo fue Ballum (34,5%), seguido de Hardjo (20,7%). Por lo tanto, en la mayoría de las investigaciones realizadas se visualiza que el serovar más frecuente correspondió a Hardjo, al igual que en el presente estudio. Las altas frecuencias de presentación del serovar Hardjo, pueden estar relacionadas con que los bovinos son hospedadores de mantención primarios para este serovar (Oliveira et al., 2010), es por esto, que la transmisión entre bovinos de un mismo rebaño o entre rebaños, podría ser una fuente importante de contagio. Por otra parte, el serovar Tarassovi se asocia a la presencia de animales silvestres y cerdos, ya que son los reservorios de este serovar (Zamora y Riedeman, 1999), por esta razón, que se cree que la alta frecuencia de este serovar se asocia a la existencia de animales silvestres en el predio donde se realizó la presente investigación.

Los serovares con mayores títulos de anticuerpos correspondieron a Tarassovi y Hardjo con títulos de 1:1600. Cabe destacar, que en el predio no había historial previo de abortos y ningún animal mostró signos clínicos de la enfermedad. Es importante recordar, que títulos desde 1:100 son suficientes para considerar la prueba MAT como positiva, y títulos mayores o iguales a 1:400 indican una infección activa o reciente (WHO y ILS, 2003). Sin embargo, la realidad del predio no se condice con lo descrito en la literatura, ya que títulos altos deberían estar acompañados de signos clínicos. Según lo descrito por Pinto et al. (2017), la leptospirosis en bovinos habitualmente ocurre de forma asintomática por serovares adaptados al huésped, específicamente aquellos del serogrupo Sejroe que incluyen los serovares Hardjoprajtmo y Hardjobovis. Sin embargo, según lo descrito por Soares et al. (2020), inclusive en infecciones con otro serogrupo diferente al Sejroe no presentan signos clínicos.

De las 24 muestras seropositivas, todas presentaron títulos de anticuerpos para más de un serovar. Según Chirathaworn et al. (2014), esto puede deberse a que se presentó reacción cruzada entre varios serovares, puesto que el serovar recién adquirido puede tener una reacción cruzada con el serovar infectante anterior, lo que lleva a la activación

de la respuesta de memoria contra el serovar anterior. También, puede deberse a que los animales están infectados con más de un serovar.

Se determinó una positividad del PCR en tiempo real de 29,5%, lo que es similar a la seropositividad a la prueba MAT. Sin embargo, la excreción renal no fue alta, excepto en una muestra donde se obtuvo 12.500 *Leptospira* por ml de orina. Esto indica que sí existe contaminación ambiental, pero en bajas cantidades. Se describe que las ratas pueden eliminar una alta cantidad de *Leptospira* por ml de orina, a diferencia de otros animales como bovinos y ciervos que eliminan menor cantidad, no obstante, debido al gran volumen de orina excretado por dichos animales, debe ser considerada una fuente importante de contaminación ambiental en comparación de las ratas (Barragan et al., 2017). En el estudio llevado a cabo por Monti et al. (2023) en seis predios lecheros en el sur de Chile, se obtuvieron cargas bacterianas que fluctuaron entre 30.000 y 44.000 *Leptospira*/ml, lo que sugiere una carga bacteriana significativamente más alta en comparación con los resultados obtenidos en este estudio.

En esta investigación, de un total de 61 muestras, 55 coincidieron los resultados de la prueba MAT y del PCR en tiempo real, por ende, la seropositividad coincide con la tasa de excreción renal. Del total de muestras analizadas, 18 de ellas coinciden en el resultado positivo para ambas pruebas diagnósticas, mientras 37 muestras coinciden en el resultado negativo. Por lo tanto, se comprobó que hay relación entre la detección de *Leptospira* patógena mediante la prueba MAT y el PCR en tiempo real.

Según la experiencia del laboratorio donde se procesaron y realizaron las pruebas diagnósticas, no es habitual que ambos métodos diagnósticos coincidan. De acuerdo Bharti et al. (2003), las leptospiras patógenas pueden aislarse de muestras de sangre y fluido cerebroespinal durante los primeros 10 días posteriores a la infección. Después de 14 días, las bacterias se recuperan principalmente en muestras de orina. En relación con la prueba MAT, Ellis (1996), menciona que los títulos de anticuerpos se suelen producir tiempo después de la infección y pueden mantenerse durante años. Lo anterior puede explicar la coincidencia observada entre ambas pruebas diagnósticas en la presente investigación; es probable que las hembras bovinas infectadas tuvieran la enfermedad desde hace tiempo, permitiendo así la detección tanto por PCR en tiempo real como por

la prueba MAT. Es importante mencionar, que la bacteria coloniza los túbulo renales proximales de los animales portadores, permitiendo que el patógeno se mantenga silenciosamente en el animal y sea excretado en la orina durante meses (Leonard et al., 1992 y Bharti et al., 2003).

Los animales del lugar donde se realizó esta investigación provienen de otros predios de la Comuna de Los Muermos. Además, como es común en la mayoría de los campos lecheros y ganaderos, no se realizan pruebas de tamizaje para identificar posibles enfermedades infecciosas, incrementando aún más el riesgo de contagio hacia los demás animales. Es importante destacar, que las hembras bovinas se mantienen en pastoreo durante todo el año, lo que favorece la infección de los animales debido a las condiciones óptimas que las praderas del sur de Chile ofrecen para la persistencia y propagación de la bacteria, especialmente por la alta humedad presente en estas áreas. Por otra parte, el agua que se les provee a los animales viene de agua de pozo y se almacena en tranques de gran tamaño, favoreciendo las condiciones ambientales para la supervivencia y propagación de las bacterias y, por ende, la propagación de la leptospirosis entre los animales.

Se obtuvo una sensibilidad de 75%, es decir, hay un 75% de probabilidad de detectar hembras bovinas que presenten excreción renal. Por otra parte, la especificidad obtenida es de 100%, por lo tanto, el PCR en tiempo real tiene un 100% de probabilidad de detectar a las hembras bovinas que no presenten eliminación renal; por ende, esta prueba diagnóstica podría servir para descartar animales que estén negativos a la enfermedad, es decir, que estén sanos. La técnica de PCR en tiempo real es capaz de detectar la presencia de *Leptospira* en animales que están excretando la bacteria a través de la orina. Por lo tanto, esta técnica es de gran utilidad en el diagnóstico para determinar la contaminación ambiental y su magnitud. Además, permite evaluar el potencial zoonótico de la infección, es decir, la posibilidad de transmisión de la enfermedad desde los animales hacia los humanos. En condiciones de campo, el PCR en tiempo real puede ser una herramienta valiosa para evaluar el riesgo de infección hacia otros animales y la contaminación ambiental asociada.

En esta investigación, el tamaño muestral (n) fue la principal limitación, puesto que el n es relativamente pequeño. Sin embargo, el objetivo de este estudio fue ver la relación entre ambas pruebas diagnósticas, es decir, la relación entre la prueba MAT y el PCR en tiempo real y ver si ambas pruebas coincidían en su resultado; lo que finalmente si se pudo llevar a cabo, dado que se pudo confirmar que las dos pruebas diagnósticas realizadas sí coinciden en la mayoría de los resultados y por ende si se pueden realizar ambas técnicas. No obstante, la prueba MAT entrega mayor información acerca de la enfermedad, ya que proporciona los títulos de anticuerpos y también el serovar y serogrupo causante de la infección, permitiendo así, saber el origen de la infección mediante los reservorios. En cambio, el PCR en tiempo real, proporciona la excreción renal de *Leptospira* por ml de orina, y, por consiguiente, se puede saber si hay contaminación ambiental y la magnitud de esta contaminación. Esto a su vez, permite implementar medidas preventivas para evitar el contagio hacia otros animales o hacia el ser humano. El control de la población de roedores, vacunación de los animales, incluyendo mascotas y evitar el acceso de agua estancada son algunas medidas para prevenir el contagio de leptospirosis entre animales. Por otra parte, para evitar el contagio hacia el ser humano, es esencial el uso de equipo de protección personal, como guantes y mascarillas cuando se trabaje con animales o en ambientes potencialmente contaminados. Además, la desinfección de heridas y el lavado de manos con agua y jabón luego del contacto con animales o agua estancada son otras medidas importantes para prevenir la transmisión de la enfermedad.

Considerando las limitaciones de esta investigación, se recomienda realizar estudios futuros que abarquen un mayor número de predios y animales, incluyendo bovinos de todas las edades. Además, de tomar muestras seriadas en distintos periodos de tiempo tanto para la prueba MAT como para el PCR en tiempo real, con el fin seguir la dinámica de la respuesta inmune con estudios epidemiológicos longitudinales o de cohorte. Asimismo, es relevante considerar medidas de prevención de esta enfermedad, dado el impacto económico significativo que genera debido a los abortos, afectando la productividad y rentabilidad de las explotaciones ganaderas y a su vez, por el potencial zoonótico que posee esta bacteria, representando un riesgo para la salud pública.

7. CONCLUSIONES

En este estudio, llevado a cabo en la Universidad San Sebastián, sede de la Patagonia y en un predio de la Comuna de Los Muermos, se comprobó la existencia de hembras bovinas seropositivas a *Leptospira* patógena utilizando la prueba MAT. Se encontró una seropositividad del 39,3%, siendo los serovares más frecuentes Hardjo y Tarassovi, con títulos de anticuerpos que oscilaron entre 1:200 a 1:1600. Además, se detectaron hembras bovinas con eliminación renal de *Leptospira* patógena mediante el PCR en tiempo real, con una tasa de excreción renal del 29,5%. La relación entre la prueba MAT y el PCR en tiempo real fue favorable, debido a que se comprobó que ambas pruebas coincidieron en la mayoría de los resultados, de un total de 61 muestras, 18 fueron positivas y 37 negativas a MAT y PCR en tiempo real. Finalmente, se determinó una sensibilidad de 75% y una especificidad del 100% del PCR en tiempo real en relación a la prueba MAT.

8. REFERENCIAS

- Adler, B y de la Peña, A. (2010). Leptospira y leptospirosis. *Microbiología Veterinaria*, 140(3-4), 287-269. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
- Alonso-Andicoberry, C., García-Peña, F. y Ortega-Mora, L.M. (2001). Epidemiología, diagnóstico y control de la leptospirosis bovina (Revisión). *Investigación Agraria. Producción y Sanidad Animales* 16(2), 205–226.
- Aqib, A. I., Ijaz, M., Farooqi, S. H., Shoaib, M., Kulyar, M. F. E. A., y Yasmeen, K. (2019). Leptospirosis: Rising Nuisance for cattle and threat to public health. In *Bacterial Cattle Diseases*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82211>
- Arent, Z., Pardyak, L., Dubniewicz, K., Plachno, B.J. y Kotula-Balak, M. (2022). Leptospira taxonomy: then and now. *Medycyna Weterynaryjna*, 78(10), 489-496. <http://dx.doi.org/10.21521/mw.6694>
- Azócar-Aedo, L., Smits, H. y Monti, G. (2014). Leptospirosis in dogs and cats: epidemiology, clinical disease, zoonotic implications and prevention. *Archivos de Medicina veterinaria*, 46(3), 337-348. <https://n9.cl/65r7q>
- Azócar-Aedo, L. (2023). Basic aspects and epidemiological studies on leptospirosis carried out in animals in Chile: a bibliographic review. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(2), 97. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8020097>
- Banco Nacional de ADN Carlos III. (2024). Programa de control de calidad de muestras de ADN y ARN. <https://n9.cl/e21tm>
- Barragan, V., Nieto, N., Keim, P., y Pearson, T. (2017). Meta-analysis to estimate the load of Leptospira excreted in urine: beyond rats as important sources of transmission in low-income rural communities. *BMC research notes*, 10, 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2384-4>
- Benavides-Romo K.L.A. y Marcillo-Arévalo, A.R. (2016). Seroprevalencia de *Leptospira* spp en hembras bovinos de fincas lecheras en el municipio de pasto, Colombia. *Revista Investigación Pecuaria*, 4(2), 27-32. <https://n9.cl/xyq7c>

- Betancur Hurtado, C., Orrego Uribe, A., y González Tous, M. (2013). Seroepidemiología de la leptospirosis en bovinos con trastornos reproductivos en el municipio de Montería, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, (26), 47-55. <https://n9.cl/n79n56>
- Biblioteca del Congreso Nacional de Chile (2020). Superficie Comunal en kilómetros Cuadrados. Consultado el 02 de noviembre de 2023, de <https://www.bcn.cl/siit/estadisticasterritoriales//resultados-consulta?id=280257>
- Bharti, A. R., Nally, J. E., Ricaldi, J. N., Matthias, M. A., Diaz, M. M., Lovett, M. A., Levett, P. N., Gilman, R. H., Willig, M. R., Gotuzzo, E., y Vinetz, J. M. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet infectious diseases*, 3(12), 757-771. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(03\)00830-2](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(03)00830-2)
- Calderón, J. M. (2023). Técnicas diagnósticas de la Leptospirosis bovina Bovine Leptospirosis and its Different Diagnostic Techniques. [Tesis de pregrado, Universidad Cooperativa de Colombia]. Repositorio Institucional UCC. <https://n9.cl/8u7a6>
- Céspedes, M. (2005). Leptospirosis: enfermedad zoonótica reemegente. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 22, 290-307. <https://n9.cl/h2pag>
- Ceva. (2022). Hay que usar mangas ganaderas para manejar rumiantes. Consultado el 30 de agosto de 2023, de <https://n9.cl/x586>
- Cilia, G., Bertelloni, F. y Fratini, F. (2020). *Leptospira* infections in domestic and wild animals. *Pathogens*, 9(7), 573. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070573>
- Cortizo, P., Loureiro, AP, Martins, G., Rosário do Rodrigues, P., Braulio Pego-Faria, B., Lilenbaum, W. y Borges-Deminicis, B. (2015). Risk factors to incidental leptospirosis and its role on the reproduction of ewes and goats of Espírito Santo state, Brazil. *Trop Anim Health Prod*, 47, 231-235. <https://doi.org.bdigitaluss.remotexs.co/10.1007/s11250-014-0684-4>

- De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I. y Vallejo, A. (2006). *Win Epi: Working in Epidemiology, an online epidemiological tool*. Proceedings of the 11th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics. <http://www.winepi.net/menu1.php>
- Decreto Exento N° 389. Establece enfermedades de declaración obligatoria para la aplicación de medidas sanitarias y deroga decretos que indica. (14 de noviembre de 2014). En Biblioteca del congreso nacional de Chile. <https://bcn.cl/2rlwg>
- Dohoo, I., Martin, W. y Stryhn, H. (2004). *Veterinary epidemiologic research*. Charlottetown, P.E.I.: University of Prince Edward Island.
- Ellis, W.A. (1996). Leptospirosis. O.I.E. Manual: Amedment I, 1-8.
- Ferreira, O., Mujica, F., Uribe, H., Lanuza, F., Quinteros, G., y Concha, C. (2010). El control lechero bovino en Chile y su importancia en el mejoramiento genético del rebaño nacional. *Agro sur*, 38(3), 178-193. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2010.v38n3-01>
- García-González, R., Reyes-Torres, A., Basilio-Hernández, D., Ramírez-Pérez, M. y Rivas-Sánchez, B. (2013). Leptospirosis; un problema de salud pública. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 60(1), 57-70. <https://n9.cl/m5cve>
- Gibson, N.J. (2006). The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clinica Chimica Acta*, 363(1-2), 32-47. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.06.022>
- Gutiérrez-Hernández, J., Palomares-Resendiz, G., Hernández-Badillo, E., Leyva-Corona, J., Díaz-Aparicio, E., y Herrera-López, E. (2021). Frecuencia de enfermedades de impacto reproductivo en bovinos de doble propósito ubicados en Oaxaca, México. *Abanico veterinario*, 10(1), 1-11. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2020.22>
- Haake, D. y Levett, P. (2015). Leptospirosis in Humans. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387, 65–97. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_5

- Hazra, A. y Gogtay, N. (2016). Biostatistics series module 4: comparing groups-categorical variables. *Indian Journal of Dermatology*, 61, 385-392.
- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, M. (2010). *Metodología de la investigación* (6a ed.). Mac Graw Hill Education/Interamericana Editores. <https://www.uca.ac.cr/wp-content/uploads/2017/10/Investigacion.pdf>
- Higino, S.S., Santos, F.A., Costa., D.F., Santos., C.S.A.B., Silva, M.L.C.R., Alves, C.J. y Azevedo, S.S. (2013). Flock-level risk factors associated with leptospirosis in dairy goats in a semiarid region of Northeastern Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, 109(1-2), 158-161. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.09.005>
- Karpagam, K.B. y Ganesh, B. (2020). Leptospirosis: a neglected tropical zoonotic infection of public health importance—an updated review. *European Journal Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 39, 835–846. <https://doi.org.bdigitaluss.remotexs.co/10.1007/s10096-019-03797-4>
- Ko, A., Goarant, C. y Picardeau, M. (2009). *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 736–747. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2208>
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Sta hlberg, A. y Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, 27(2-3), 95-125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>
- León-Vizcaino, L., Hermoso de Mendoza, M. y Garrido, F. (1987). Incidence of abortions caused by leptospirosis in sheep and goats in Spain. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 10(2), 149-153. [https://doi.org/10.1016/0147-9571\(87\)90009-9](https://doi.org/10.1016/0147-9571(87)90009-9)
- Leonard, F. C., Quinn, P. J., Ellis, W. A., y O'farrell, K. (1992). Duration of urinary excretion of leptospire by cattle naturally or experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *The Veterinary Record*, 131(19), 435-439.

- Levett, P. (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2), 296–326. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>
- López-Robles, G., Córdova-Robles, F., Sandoval-Petris, E. y Montalvo-Corral, M. (2021). Leptospirosis at human-animal-environment interfaces in Latin-America: drivers, prevention, and control measures. *Biocencia*, 23(3), 89-100. <https://doi.org/10.18633/biocencia.v23i3.1442>
- Macias, D. B., Ruano, M. P., Goicochea, C. B., Aguayo, M. Z., Valencia, H. S., y Falconí, M. A. (2019). Determinación de la seroprevalencia de *Leptospira* spp. y los principales serovares circulantes en el ganado bovino en la provincia de Manabí, Ecuador. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*, 38(3), 2.
- Martins, G., Brandão, F.Z., Hamond, C., Medeiros, M. y Lilenbaum, W. (2012). Diagnosis and control of an outbreak of leptospirosis in goats with reproductive failure. *The Veterinary Journal*, 193(2), 600-601. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.01.016>
- Martins, G. y Lilenbaum, W. (2014). Leptospirosis in sheep and goats under tropical conditions. *Trop Anim Health Prod*, 46, 11-17. <https://doi.org/bdigitaluss.remotexs.co/10.1007/s11250-013-0480-6>
- Ministerio de Salud de Chile, (2020). Informe epidemiológico anual, Chile, Leptospirosis año 2018. <https://n9.cl/bo2kni>
- Monroy-Díaz, Á. L., Vargas-Arias, J. A., Filippo-Iriarte, G. D., y Quimbaya-Ramírez, J. J. (2020). Leptospirosis en reservorios animales: una revisión de tema. *Revista Lasallista de Investigación*, 17(2), 266-279. <http://dx.doi.org/10.22507/rli.v17n2a23>
- Monti, G., Montes, V., Tortosa, P., Tejada, C y Salgado, M. (2023). Urine shedding patterns of pathogenic *Leptospira* spp. in dairy cows. *Veterinary Research*, 54(64) <https://doi.org/10.1186/s13567-023-01190-w>
- Mwachui, M.A., Crump, L., Hartskeerl, R., Zinsstag, J. y Hattendorf, J. (2015). Environmental and Behavioural Determinants of Leptospirosis Transmission: A

- Systematic Review. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9(9).
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003843>
- Noordhuizen, J., Frankena, K., Van der Hoofd, C. y Graat, E. (1997). *Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology* (1a ed.). Wageningen Pers.
<https://n9.cl/6ja4r>
- Ojeda, J., Salgado, M., Encina, C., Santamaria, C. y Monti, G. (2018). Evidence of interspecies transmission of pathogenic *Leptospira* between livestock and a domestic cat dwelling in a dairy cattle farm. *The Journal of Veterinary Medical Science* 80(8), 1305-1308. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0361>
- Oliveira, F., Azevedo, S. S., Pinheiro, S. R., Batista, C. S., Moraes, Z. M., Souza, G. O. y Vasconcellos, S. A. (2010). Factores de riesgo para la leptospirosis en hembras bovinas en edad reproductiva en el Estado de Bahía, Nordeste de Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30, 398-402. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010000500004>
- Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. (2017). Manual Veterinario de Toma y Envío de Muestras. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/34527>
- Organización Mundial de la Sanidad Animal (2021). *Leptospirosis, Manual terrestre de la OIE*. <https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre>
- Orsi Dutra, M. A., Bezerra Bertolini, A., Manzini, S., Guiraldi, L. M., dos Santos, W. J., Neves Aires, I. y Baldini Lucheis, S. (2022). Diagnóstico de leptospira spp. en bovinos sacrificados en Brasil. *Vet. zootec*, 1-8. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1433662>
- Pal, M., Bulcha, M. R., y Bune, W. M. (2021). Leptospirosis and One health perspective. *American Journal of Public Health* 9(4), 180-183. <https://doi.org/10.12691/ajphr-9-4-9>

- Picardeau, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 13(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.11.005>
- Pinto, P. S., Pestana, C., Medeiros, M. A., y Lilenbaum, W. (2017). Plurality of *Leptospira* strains on slaughtered animals suggest a broader concept of adaptability of leptospires to cattle. *Acta Tropica*, 172, 156-159. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.04.032>
- Romero, M. (2011). La prueba chi-cuadrado o ji-cuadrado (χ^2). *Enfermería del Trabajo*, 1(1), 31–38. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3995561>
- Salazar, G. J. V. (2017). Importancia del cálculo de la sensibilidad, la especificidad y otros parámetros estadísticos en el uso de las pruebas de diagnóstico clínico y de laboratorio. *Medicina y laboratorio*, 23(7), 365-386. <https://doi.org/10.36384/01232576.34>
- Salgado, M., Otto, B., Sandoval, E., Reinhardt, G. y Boqvist, S. (2014). A cross sectional observational study to estimate herd level risk factors for *Leptospira* spp. Serovars in small holder dairy cattle farms in southern Chile. *BMC Veterinary Research*, 10(126), 1746-6148. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-126>
- Salgado, M., Otto, B., Moroni, M., Sandoval, E., Reinhardt, G., Boqvist, S., Encina, C. y Muñoz-Zanzi, C. (2015). Isolation of *Leptospira interrogans* serovar Hardjoprajitno from a calf with clinical leptospirosis in Chile. *BMC Veterinary Research* 11(66). <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0369-x>
- Silvaa, R. y Riedemannb, S. (2007). Seroprevalencia de leptospirosis canina en perros atendidos en clínicas veterinarias, mediante aglutinación microscópica y comparación con las técnicas de aislamiento e inmunofluorescencia indirecta. *Arch. Med. Vet*, 39(3). <https://scielo.conicyt.cl/pdf/amv/v39n3/art11.pdf>
- Soares, P. M., Gomes, D. O., Macedo, F. P., Soares, M. M., Lemes, K. R., Jaeger, L. H., Lilenbaum, W., y Lima, A. M. (2020). Serological and molecular characterization of *Leptospira kirschneri* serogroup Grippotyphosa isolated from bovine in

Brazil. *Microbial pathogenesis*, 138, 103803.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103803>

Stoddard, R. A., Gee, J. E., Wilkins, P. P., McCaustland, K., y Hoffmaster, A. R. (2009). Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 64(3), 247-255. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014>

Sykes, J.E., Haake, D.A., Gamage, C.D., Mills, W.Z. y Nally, J.E. (2022). A global one health perspective on leptospirosis in humans and animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 260(13), 1589-1596. <https://doi.org/10.2460/javma.22.06.0258>

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.

Torres-Castro, M., Hernández-Betancourt, S., Agudelo-Flórez, P., Arroyave-Sierra, E., Zavala-Castro, J., y Puerto, F. I. (2016). Revisión actual de la epidemiología de la leptospirosis. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 54(5), 620-625. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=67886>

Thursfield, M. (1990). *Epidemiología veterinaria* (1a ed.) [s.n]. Acribia. https://www.editorialacribia.com/libro/epidemiologia-veterinaria_53579/

World Health Organization and International Leptospirosis Society. (2003). Human leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. <https://n9.cl/z6s5f>

Zamora, J., Kruze, J., y Riedemann, S. (1975). Leptospirosis de los animales domésticos en el Sur de Chile. Estudio Serológico. *Zoon. Public Health*, 22, 544-555. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1975.tb00622.x>

Zamora, J., Riedemann, S., Montecinos, M. y Cabezas, X. (1991). Detección de *Leptospira* serovares Hardjo y Kennewicky en bovinos aparentemente sanos. *Arch. Med. Vet*, 23, 131-135. <https://n9.cl/vm0ea>

Zamora, J. y Riedemann, S. (1999). Animales silvestres como reservorios de leptospirosis en Chile: Una revisión de los estudios efectuados en el país. *Archivos de medicina veterinaria*, 31(2), 151-156. <https://n9.cl/bkxq7>

9. ANEXOS

9.1 Anexo 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____,
autorizo con pleno conocimiento, la extracción de una muestra de sangre mediante la técnica de venopunción y la recolección de una muestra de orina por medio de la técnica de masaje perineal para la realización del diagnóstico de la infección por *Leptospira* patógena a través de la Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT) y la Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) en tiempo real de la hembra bovina DIOO número: _____

El procedimiento en cuestión forma parte del proyecto de memoria para optar al título de Médico Veterinario de la estudiante de Medicina Veterinaria de la Universidad San Sebastián, Srta. Paz Belén Loebel Salgado, titulado: “Relación entre la detección por serología y la reacción de Polimerasa en Cadena en tiempo real, de la infección por *Leptospira* patógena en hembras bovinas de la Región de Los Lagos”.

El objetivo general del proyecto de memoria de título es: realizar un estudio epidemiológico para identificar hembras bovinas seropositivas a *Leptospira* patógena mediante la prueba de Aglutinación Microscópica (MAT) y también animales que eliminen la bacteria a través de la orina identificados mediante la Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) en tiempo real.

La información obtenida con este proyecto se utilizará solamente con fines académicos.

Firma

Fecha: _____

9.2 Anexo 2

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____,
autorizo con pleno conocimiento, la extracción de una muestra de sangre mediante la técnica de venopunción y la recolección de una muestra de orina por medio de la técnica de masaje perineal para la realización del diagnóstico de la infección por *Leptospira* patógena a través de la Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT) y la Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) en tiempo real, en las hembras bovinas del plantel de animales a mi cargo.

El procedimiento en cuestión forma parte del proyecto de memoria para optar al título de Médico Veterinario de la estudiante de Medicina Veterinaria de la Universidad San Sebastián, Srta. Paz Belén Loebel Salgado, titulado: “Relación entre la detección por serología y la reacción de Polimerasa en Cadena en tiempo real, de la infección por *Leptospira* patógena en hembras bovinas de la Región de Los Lagos”.

El objetivo general del proyecto de memoria de título es: realizar un estudio epidemiológico para identificar hembras bovinas seropositivas a *Leptospira* patógena mediante la prueba de Aglutinación Microscópica (MAT) y también animales que eliminen la bacteria a través de la orina identificados mediante la Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) en tiempo real.

La información obtenida con este proyecto se utilizará solamente con fines académicos.

Firma

Fecha: _____

9.3 Anexo 3

Protocolo Prueba de Aglutinación Microscópica (Microscopic Agglutination Test (MAT):

- Fase 1: Cribado

Primera parte:

- 1) Rotular los tubos de ensayo con el número de la muestra a analizar.
- 2) En cada tubo de ensayo, colocar 4,9 ml de suero fisiológico.
- 3) Colocar 0,1 ml (100 microlitros) del suero problema en cada tubo con 4,9 ml de suero fisiológico (quedan en dilución 1:50).
- 4) Colocar 0,1 ml de la muestra de suero problema en dilución 1:50 en un tubo de ensayo vacío y agregar 0,1 ml del serovar (por ejemplo, Hardjo). Esto se repite para todos los serovares en análisis.

Segunda parte:

- 1) Colocar 0,3 ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo vacío.
- 2) Encender el mechero.
- 3) Homogeneizar los tubos de los serovares (con un vórtex).
- 4) Abrir los tubos de los serovares cerca del mechero. Sacar 0,1 ml y agregarlo al tubo de ensayo que contiene los 0,3 ml de suero fisiológico. Esto se repite para todos los serovares en análisis.

Todos estos tubos se incuban en estufa a 37 °C durante 2 a 4 horas.

Tercera parte:

La lectura se realiza en un microscopio de campo oscuro de la siguiente manera:

- 1) En un portaobjetos limpio y desengrasado, se coloca: una gota del suero problema-serovar y una gota del control suero fisiológico-serovar.

2) Si la gota suero problema-serovar tiene igual o más leptospiras que la gota control suero fisiológico-serovar, la muestra se considera “negativa” (no tiene anticuerpos anti-*Leptospira*).

3) Si la gota suero problema-serovar tiene menos leptospiras que la gota control suero fisiológico-serovar, la muestra suero problema se considera “positiva”.

- Fase 2: Titulación

El suero problema positivo al cribado se debe titular para saber hasta qué dilución presenta anticuerpos anti-*Leptospira*.

Para titular UN suero que dio positivo a UN serovar, el procedimiento es el siguiente:

1) En una gradilla, se colocan 5 tubos de ensayo de forma horizontal y se rotulan (1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600).

2) Desde el tubo número 2 al tubo número 5, se les pondrá 0,2 ml de suero fisiológico en cada uno.

3) Al primer y segundo tubo, se le colocan 0,2 ml de suero fisiológico.

4) Diluciones: desde el tubo 2 (que tiene 0,4 ml), se traspasan 0,2 ml al tubo 3, 0,2 ml al tubo 4 y 0,2 ml al tubo 5, eliminando 0,2 ml del último tubo.

5) A cada tubo, se le agregarán 0,2 ml del serovar de *Leptospira* al cual dio positivo y se está titulado, por ejemplo, Hardjo.

6) Además, se debe hacer un control que contendrá 0,3 ml de suero fisiológico y 0,1 ml del serovar que se está titulado.

7) Las gradillas con los tubos se incuban a 37 °C durante 2 a 4 horas.

8) Lectura: en un portaobjetos limpio y desengrasado, se coloca una gota del tubo control y una gota de cada uno de los tubos de las diluciones.

La lectura se sigue hasta la gota en donde hay menos leptospiras que el control y ese es el título de anticuerpos que hay que reportar. Por ejemplo: 1:800.

Una vez que ya se realizó el cribado y titulación, los tubos se descartan en un envase que contiene una dilución de agua y cloro, posteriormente se lavan y se esterilizan con autoclave para ser reutilizados.

9.4 Anexo 4

Muestra	qPCR	Concentración ADN (ng/ul)	A260/A 280
Bovino 1	(-) Negativo	18,3	1,66
Bovino 2	(-) Negativo	24,5	1,43
Bovino 3	(-) Negativo	31,2	1,53
Bovino 4	(-) Negativo	17,7	1,75
Bovino 5	(-) Negativo	29,5	1,68
Bovino 6	(-) Negativo	36,5	1,82
Bovino 7	(-) Negativo	41,2	1,73
Bovino 8	(-) Negativo	18,7	1,49
Bovino 9	(-) Negativo	19,6	1,62
Bovino 10	(-) Negativo	22,4	1,75
Bovino 11	(-) Negativo	27,8	1,82
Bovino 12	(-) Negativo	29,2	1,54
Bovino 13	(+) Positivo	30,3	1,49
Bovino 14	(-) Negativo	29,6	1,68
Bovino 15	(+) Positivo	22,9	1,74
Bovino 16	(-) Negativo	38,3	1,39
Bovino 17	(-) Negativo	41,3	1,27
Bovino 18	(-) Negativo	26,6	1,66
Bovino 19	(-) Negativo	32,7	1,43
Bovino 20	(+) Positivo	36,2	1,51
Bovino 21	(-) Negativo	29,5	1,55
Bovino 22	(+) Positivo	19,3	1,63
Bovino 23	(-) Negativo	24,4	1,37
Bovino 24	(+) Positivo	57,3	1,43
Bovino 25	(+) Positivo	28,4	1,32
Bovino 26	(+) Positivo	39,8	1,53
Bovino 27	(-) Negativo	22,3	1,29
Bovino 28	(-) Negativo	14,8	1,32
Bovino 29	(-) Negativo	54,1	1,27
Bovino 30	(-) Negativo	32,6	1,45
Bovino 31	(+) Positivo	22,7	1,35
Bovino 32	(-) Negativo	31,2	1,67

Bovino 33	(+) Positivo	34,5	1,84
Bovino 34	(+) Positivo	33,3	1,39
Bovino 35	(-) Negativo	19,5	1,48
Bovino 36	(+) Positivo	24,8	1,55
Bovino 37	(-) Negativo	34,2	1,64
Bovino 38	(-) Negativo	24,9	1,21
Bovino 39	(-) Negativo	31,3	1,49
Bovino 40	(-) Negativo	28,6	1,44
Bovino 41	(-) Negativo	33,2	1,32
Bovino 42	(-) Negativo	43,6	1,54
Bovino 43	(+) Positivo	39,3	1,38
Bovino 44	(-) Negativo	27,7	1,45
Bovino 45	(-) Negativo	23,8	1,65
Bovino 46	(-) Negativo	17,3	1,77
Bovino 47	(-) Negativo	37,2	1,81
Bovino 48	(+) Positivo	31,7	1,67
Bovino 49	(+) Positivo	29,4	1,36
Bovino 50	(-) Negativo	23,1	1,43
Bovino 51	(+) Positivo	50,4	1,54
Bovino 52	(+) Positivo	38,9	1,67
Bovino 53	(-) Negativo	22,7	1,34
Bovino 54	(-) Negativo	34,6	1,47
Bovino 55	(-) Negativo	48,1	1,72
Bovino 56	(+) Positivo	39,2	1,26
Bovino 57	(-) Negativo	44,1	1,65
Bovino 58	(-) Negativo	29,5	1,48
Bovino 59	(-) Negativo	Sin datos	Sin datos
Bovino 60	(+) Positivo	Sin datos	Sin datos
Bovino 61	(-) Negativo	Sin datos	Sin datos