



**UNIVERSIDAD
SAN SEBASTIAN**
VOCACIÓN POR LA EXCELENCIA

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

**ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE LEPTOSPIROSIS EN
RUMIANTES ATENDIDOS EN EL HOSPITAL CLÍNICO
VETERINARIO DE LA UNIVERSIDAD SAN SEBASTIÁN, SEDE
DE LA PATAGONIA**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO

Profesor guía: Ph. D. Lucía Azócar Aedo

Estudiante: Mauricio Alexis Uribe Soto

Puerto Montt, Chile

2024

® MAURICIO URIBE SOTO

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 23 de julio de 2024, los abajo firmantes dejan constancia que el (la) estudiante Mauricio Alexis Uribe Soto de la carrera de Medicina Veterinaria ha aprobado su Memoria de Título para optar al grado de Médico Veterinario con una nota de 5,8



Dra. Lucía Azocar



Dr. Alfredo Rodríguez



Dr. Fernando Jiménez

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Principales signologías.....	2
1.2 Patogenia	2
1.3 Métodos de diagnóstico de <i>Leptospira</i> patógena	3
1.4 Estudios sobre leptospirosis en rumiantes en Chile	4
1.5 Aporte de esta investigación	5
2. OBJETIVOS	7
2.1 Objetivo general	7
2.2 Objetivos específicos	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1 Diseño del estudio.....	8
3.2 Especies animales en estudio.....	8
3.3. Determinación del tamaño muestral.....	8
3.4. Obtención de las muestras de sangre	9
3.6. Cálculo de la tasa de seropositividad.....	10
3.7. Análisis de los datos	11
3.8. Presentación de los resultados el estudio.....	11
3.9. Aspectos éticos	11
4. RESULTADOS.....	12
4.1 Tasa de seropositividad para <i>Leptospira patógena</i> en animales rumiantes utilizando la Prueba MAT como ensayo diagnóstico.....	12
4.2. Serogrupos más comunes de <i>Leptospira</i> patógena en el Hospital Clínico Veterinario.	14
4.3. Reactividad serológica y títulos de anticuerpos para serogrupos de <i>Leptospira</i> patógena utilizando la prueba MAT.....	16
5. DISCUSIÓN	19
6. CONCLUSIONES.....	24
7. REFERENCIAS	25
8. ANEXOS	31
Anexo A.....	31
Anexo B.....	33

Anexo C..... 34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Distribución de la seropositividad a <i>Leptospira</i> patógena en rumiantes. Hospital Clínico Veterinario, Universidad San Sebastián, sede de la Patagonia. Diciembre año 2022 a junio año 2023. Puerto Montt, Región de Los Lagos.	12
Figura 2 Porcentaje de serogrupos en los rumiantes muestreados seropositivos a <i>Leptospira</i> patógena. Hospital Clínico Veterinario, Universidad San Sebastián, sede de la Patagonia. Diciembre año 2022 a junio año 2023. Puerto Montt, Región de Los Lagos.	15
Figura 3 Distribución de frecuencias en porcentajes para los títulos de anticuerpos en los rumiantes muestreados seropositivos a <i>Leptospira</i> patógena. Hospital Clínico Veterinario, Universidad San Sebastián, sede de la Patagonia. Diciembre año 2022 a junio año 2023. Puerto Montt, Región de Los Lagos.	17

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Tamaño muestral de cada especie con la cantidad de muestras positivas y negativas a la prueba MAT con su respectiva tasa de seropositividad y su IC 95%. Hospital Clínico Veterinario, Universidad San Sebastián, sede de la Patagonia. Diciembre año 2022 a junio año 2023. Puerto Montt, Región de Los Lagos.	13
Tabla 2 Número y porcentaje de muestras positivas para cada serogrupo de <i>Leptospira</i> patógena según especie animal. Hospital Clínico Veterinario, Universidad San Sebastián, sede de la Patagonia. Diciembre año 2022 a junio año 2023. Puerto Montt, Región de Los Lagos.	14
Tabla 3 Número y porcentaje de títulos de anticuerpos en las muestras positivas a <i>Leptospira</i> patógena según especie animal. Hospital Clínico Veterinario, Universidad San Sebastián, sede de la Patagonia. Diciembre año 2022 a junio año 2023. Puerto Montt, Región de Los Lagos.	16

RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana extendida mundialmente que afecta gravemente la salud y producción del ganado, causando abortos, mortinatos y nacimientos de animales débiles. Existen más de 250 serotipos y 24 serogrupos patógenos. Es especialmente prevalente en climas tropicales y subtropicales, donde las condiciones ambientales favorecen la supervivencia de la leptospira. En los rumiantes, la enfermedad puede cursar con problemas reproductivos y síntomas graves como fiebre, anemia, e ictericia. La patogenia de la enfermedad implica daño a los vasos sanguíneos, riñones, pulmones, hígado, y otros órganos. El estándar de oro para el diagnóstico es la prueba de aglutinación microscópica (MAT), aunque también se utilizan pruebas de inmunohistoquímica, ELISA y PCR. El presente estudio, tuvo como objetivo general detectar seropositividad a *Leptospira* patógena en rumiantes atendidos en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad San Sebastián, Sede la Patagonia, mediante la Prueba de MAT. Se muestrearon 43 animales de diferentes especies (bovinos, ovinos, caprinos y alpaca), de los cuales, 30 tuvieron una exposición a *Leptospira* spp, dando una tasa de seropositividad del 69,7% (IC 95% = 56,0-83,4). En bovinos, la tasa de seropositividad fue de un 85,0% (IC 95% = 69,0-100), mientras que, en ovinos, caprinos y alpacas fue de 66,7% (IC 95% = 32,2-87,0), 25,0 (IC 95% = 0-67,4) y 0%, respectivamente. Además, se detectó una alta frecuencia de muestras reactivas a el serogrupo Tarassovi (70,0%) y otros serogrupos diagnosticados fueron Sejroe (30,0%) y Autumnalis (10,0%). Los títulos de anticuerpos en los animales seropositivos variaron entre 1:100 y 1:1600, observándose una mayor frecuencia de títulos de 1:400 (36,6%), 1:800 (30,0%) y 1:200 (16,6%). Considerado lo anterior, son necesarias nuevas investigaciones científicas que exploren la función epidemiológica de distintas especies de animales rumiantes y su interacción con los distintos serogrupos/serovares de *Leptospira* patógena tanto en Chile, como en el mundo.

Palabras claves: *Leptospira* spp, Rumiantes, Prueba de Aglutinación Microscópica, seropositividad.

ABSTRACT

Leptospirosis is a globally widespread bacterial disease affecting health and production of livestock, causing abortions, stillbirths, and births of weak animals. There are more than 250 serotypes and 24 pathogenic serogroups. It is especially prevalent in tropical and subtropical climates, where environmental conditions favor the survival of *Leptospira*. In ruminants, the disease can cause reproductive problems and serious symptoms such as fever, anemia, and jaundice. The pathogenesis of the disease involves damage to blood vessels, kidneys, lungs, liver, and other organs. The gold standard for diagnosis is the Microscopic Agglutination Test (MAT), although immunohistochemistry, ELISA and PCR tests are also used. The general objective of the present study was to detect seropositivity to pathogenic *Leptospira* in ruminants at the Veterinary Clinical Hospital of the San Sebastián University, Patagonia Campus, using the MAT. A total of 43 animals of different species (cattle, sheep, goats and alpaca) were sampled, of which 30 had exposure to *Leptospira spp*, with a seropositivity rate of 69.7% (95% CI = 56.0-83.4). In cattle, the seropositivity rate was 85.0% (95% CI = 69.0-100), while in sheep, goats and alpacas it was 66.7% (95% CI = 32.2-100), 87.0%, 25.0% (95% CI = 0-67.4) and 0%, respectively. In addition, a high frequency of samples reactive to the Tarassovi serogroup was detected (70.0%) and other serogroups diagnosed were Sejroe (30.0%) and Autumnalis (10.0%). Antibody titers in seropositive animals ranged between 1:100 and 1:1600, with a higher frequency of titers of 1:400 (36.6%), 1:800 (30.0%) and 1:200 (16,6%). More scientific research is necessary to explore the epidemiological function of different species of ruminant animals and their interaction with the different serogroups/serovars of pathogenic *Leptospira* both in Chile and in the world.

Keywords: *Leptospira spp*, Ruminants, Microscopic Agglutination Test, seropositivity.

1. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana de distribución ubicua que desafía considerablemente la salud y producción del ganado a nivel mundial (Mughini-Gras et al., 2014) por generar abortos, mortinatos y nacimiento de animales débiles. Los países con climas tropicales con su alta frecuencia de lluvias, las temperaturas cálidas y el pH del suelo, tienen las características climáticas perfectas para la supervivencia de la leptospira, además estas ayudan a la conservación de su patogenicidad durante largos períodos (Andre-Fontaine et al., 2015; Martins y Lilenbaum, 2015).

Las *leptospiras*, agente que convoca a la enfermedad, son espiroquetas pertenecientes a la familia de las leptospiráceas, de las cuales se reconocen más de 250 serotipos patógenos y 24 serogrupos patógenos (Haji Hajikolaei et al., 2022), siendo los serogrupos *Pomona* y *Sejroe (Hardjo)* los más importantes dentro de la zona sur de Chile al ser endémica, lo que provoca un alto número de rumiantes infectados (Salgado et al., 2014).

Los hospedadores que albergan los serogrupos de la bacteria se dividen en dos grandes grupos. El primero son llamados hospedadores de mantención y son definidos por cepas adaptadas y portadas por el huésped afectado, que dependen de la región o de las condiciones ambientales, como la topografía o las precipitaciones y generalmente conducen a una infección subclínica, volviéndose una fuente importante de infección para humanos u otros animales (Suepaul et al., 2011).

El segundo grupo son los hospedadores accidentales (también llamados “incidentales”), los cuales se infectan por cepas de *Leptospira* portadas por otros animales domésticos y de vida libre y esto provoca que sean más dependientes de factores de ambientales y de manejo que facilitan el contacto directo e indirecto con los reservorios de la bacteria que eliminan el microorganismo a

través de la orina por períodos de tiempo considerables (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010).

1.1 Principales signologías

Para el primer grupo descrito anteriormente, algunos de los animales que son normalmente huéspedes de mantención son los rumiantes como el bovino, ovino y caprino. En el bovino los signos clínicos son reproductivos como el aborto, la mortinatalidad o la infertilidad. Cuando la enfermedad pasa a ser multisistémica aguda grave, que suelen padecer los terneros y vacas lactantes, los terneros, presentan fiebre, anemia hemolítica, hemoglobinuria e ictericia y esta afección también es conocida como “síndrome del ternero débil” y en vacas lactantes se presenta agalactia y sangre en la leche (Mughini-Gras et al., 2014; Sykes et al., 2022).

En ovinos, la infección aguda está representada por pérdida de apetito, irritabilidad, diarrea, opacidad en la piel, abortos y el síndrome de la caída de la leche (Ellis, 1994; Martins et al., 2012). En caprinos la enfermedad tiene un curso agudo o crónico con síntomas comunes como anemia, ictericia y hemoglobinemia; y también puede haber otros animales que son afebriles y no ictéricos (Monahan et al., 2009). En pequeños rumiantes también son frecuentes los signos reproductivos como abortos, infertilidad, mortinatalidad y nacimiento de crías débiles (Martins y Lilenbaum, 2014).

1.2 Patogenia

La fase de crecimiento bacteriano dura 7 días. Cuando los niveles de *Leptospira* alcanzan un nivel exponencial máximo, se empiezan a generar los síntomas por los componentes celulares tóxicos y/o las toxinas leptospirales. Lo primero que se ve dañado es el endotelio de los vasos sanguíneos, lo que conlleva a una isquemia localizada en los diferentes órganos afectados. En el riñón, la isquemia induce una necrosis tubular renal y en el pulmón genera embolia pulmonar, lo mismo ocurre en el hígado en donde se induce una lesión hepatocelular post-isquémica, puede haber un daño a nivel del sistema nervioso produciendo meningitis. A nivel muscular se observa miositis y en el útero, cuando el

hospedador está en gestación puede haber placentitis. En casos muy avanzados se pueden observar hemorragias severas, ictericia y trombocitopenia (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010).

Cuando llegan a los riñones, las espiroquetas son excretadas por la orina y se produce la contaminación en el ambiente (Loureiro y Lilenbaum, 2020). La duración y la cantidad de la *Leptospira* excretada en la orina varía entre especies de animales y dependiendo del serogrupo infectante. En el caso de hospedadores de mantención como el bovino infectado por *Sejroe* (serovar *Hardjo*), el mayor nivel de leptospiuria es entre las primeras 4 a 6 semanas y será constante en este intervalo de tiempo, luego viene una fase intermitente donde baja la leptospiuria y normalmente dura 6 a 12 meses en bovinos, pero puede persistir por toda la vida del animal, en cambio en el ovino cuando está infectado con *Hardjo* la intensidad de la leptospiuria es menor (Ellis, 1994).

1.3 Métodos de diagnóstico de *Leptospira* patógena

El diagnóstico de la leptospirosis puede ser dificultoso, debido a la gran variedad en la signología clínica que presenta en los animales afectados, e incluso algunas manifestaciones son asintomáticas. Por esto, es imprescindible realizar pruebas de laboratorio para diagnosticar la enfermedad. Estas pruebas diagnósticas, se dividen en dos grupos. El primero detecta los anticuerpos anti-*Leptospira*, y el segundo está diseñado para identificar evidencias de *Leptospira*, antígenos o ácidos nucleicos de la bacteria en tejidos o líquidos corporales del hospedador (OIE, 2021).

El primer grupo es el diagnóstico más utilizado y se toma como prueba de oro para la identificación de leptospirosis. Estas son la prueba de inmunoabsorción enzimática unida a enzimas para identificar anticuerpos IgM (ELISA) y la prueba de aglutinación microscópica (MAT) (Picardeau, 2013), la última mencionada, será la prueba de elección para este estudio.

El segundo grupo pertenece principalmente a la prueba inmunohistoquímica y la prueba de reacción en cadena a la polimerasa (PCR). Las pruebas inmunológicas son más fáciles de adaptar a las condiciones en un laboratorio,

no obstante, presenta menos sensibilidad comparada con un cultivo bacteriológico y necesita una gran cantidad de carga patógena que se encuentre en el tejido, salvo que se ocupen reactivos especializados y aun así se necesita de estar acompañado de una prueba serológica para la interpretación de los resultados. La segunda mencionada (PCR) presenta gran sensibilidad y rápido diagnóstico, sin embargo, esta prueba no identifica el serotipo o serovar infectante como en la prueba MAT, la cual presenta importancia epidemiológica por esta razón (OIE, 2021).

1.4 Estudios sobre leptospirosis en rumiantes en Chile

En Chile la leptospirosis en humanos es una enfermedad de notificación obligatoria al Ministerio de Salud (MINSAL, 2020). Los casos notificados de esta afección son escasos, aun así, se han reportado sucesos en diferentes regiones del país (Azócar-Aedo, 2023).

En diferentes especies de animales se han hecho estudios en Chile. Los caninos y equinos son las especies que tienen más estudios sobre *Leptospira*, en rumiantes al contrario de las especies anteriormente mencionadas las investigaciones son limitadas (Azócar-Aedo, 2023).

Uno de los estudios más recientes que se han hecho en Chile en bovinos se publicó en el año 2021, el cual tenía como objetivo estimar la carga bacteriana de *Leptospira* en vacas lecheras del sur de Chile e identificar los factores asociados con el estatus a nivel de rebaño de la región de los Ríos y de los Lagos, a través de muestras de sangre y mediante la prueba MAT. Se obtuvieron un total de 4.876 muestras de sangre del mismo número de vacas lactantes de 150 rebaños. La prevalencia general estimada a nivel de rebaño fue del 42,2% y concluyeron que las prácticas de manejo reproductivo estaban relacionadas con la posibilidad de que un rebaño tuviera al menos un animal de reactor contra *Leptospira spp.* (Montes & Monti, 2021).

Otro estudio realizado en bovinos el año 2022, consistió en un análisis anatómico e histopatológico de fetos abortados con lesiones compatibles con leptospirosis y el análisis de las muestras de orina y de sangre de las vacas que abortaron

donde se concluyó que el tiempo transcurrido desde que se produce un evento clínico y el tipo de muestra clínica tomada son elementos clave en la confirmación exitosa de la *Leptospira* patógena como causa del aborto (Tomckowiack et al., 2022).

En ovinos solo hay dos estudios en Chile (Azócar-Aedo, 2023) uno realizado en el año 1975 en la zona sur de Chile, el cual no entrega información de su tamaño muestral, pero sí, dio como resultado una seroprevalencia de 7,4% mediante la prueba diagnóstica MAT (Zamora et al., 1975) y el otro publicado en el año 1999 llevado a cabo en la Región de Los Lagos en la zona sur de Chile, tuvo un tamaño muestral de 629 animales, 36 de estos dieron seropositivos dando una seroprevalencia de 5,7% detectada con la prueba diagnóstica MAT (Zamora et al., 1999).

En caprinos solo hay un estudio (Azócar-Aedo, 2023), realizado en el sur de Chile, el cual no da a conocer el tamaño muestral, tampoco los animales positivos, sin embargo, determina una seroprevalencia de anticuerpos anti-*Leptospira* de 24,8% con la prueba MAT (Zamora et al., 1975).

1.5 Aporte de esta investigación

La pandemia mundial causada por la enfermedad por coronavirus (COVID-19) recuerda la amenaza de las enfermedades infecciosas para la salud humana (Li, et al. 2022), actualmente la prevención de la leptospirosis es extremadamente limitada, aun siendo una zoonosis que afecta a todo el mundo sobre todo en países tropicales y subtropicales, además, tiene una importancia económica en la ganadería. Sin embargo, en Chile, el conocimiento de la leptospirosis sigue siendo deficiente, si bien, se han publicado algunas investigaciones en especies como felinos domésticos, rumiantes y cerdos, muchos resultados datan de años o décadas atrás y están desactualizados por lo que se necesitan más estudios epidemiológicos (Azócar-Aedo, 2023) .

El ganado rumiante, que es un hospedador permanente tiene una íntima conexión en la transmisión de la bacteria en los humanos, ya sea de manera indirecta donde los charcos, lagunas, aguas estancadas y materiales inertes se

contaminan fácilmente con orina o de manera directa por contacto de secreciones del animal infectado (Hernandez et al., 2001). Es por esto, que el estudio tiene como finalidad otorgar una conciencia de lo cercano que estamos de esta bacteria, que es de importancia de salud pública a nivel mundial. Además, se quiere generar conocimiento de la tasa de positividad e identificar los serogrupos más comunes de los rumiantes de la región de Los Lagos y sus zonas aledañas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Realizar un estudio epidemiológico para detectar seropositividad a *Leptospira patógena* en animales rumiantes que son atendidos en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad San Sebastián, sede de la Patagonia.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Calcular la tasa de seropositividad para *Leptospira patógena* en animales rumiantes utilizando la Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT) como ensayo diagnóstico.
- 2) Identificar los serogrupos más comunes de *Leptospira patógena* en el Hospital Clínico Veterinario.
- 3) Determinar la reactividad serológica y títulos de anticuerpos para serogrupos de *Leptospira patógena* mediante la prueba MAT.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño del estudio

El diseño del estudio fue descriptivo, transversal (prevalencia), observacional y cuantitativo (Hernández et al., 2011).

3.2 Especies animales en estudio

La investigación se realizó en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad San Sebastián, sede de la Patagonia desde diciembre de 2022 a junio de 2023, donde habitualmente llegan diferentes especies en busca de alguna atención médica. Las especies de animales a analizar fueron bovinos (*Bos taurus*), ovinos (*Ovis aries*) caprinos (*Capra hircus*) y alpacas (*Vicugna pacus*). Si bien la ciudad de Puerto Montt fue el área principal en estudio, los pacientes provinieron desde localidades como Maullín, Los Muermos, Llanquihue, Frutillar y otros lugares aledaños de toda la Región de Los Lagos.

A cada propietario de los animales se solicitó suscribir un consentimiento informado en el cual se expresó la autorización para participar en el estudio (Anexo A).

Si bien en Chile se utilizan vacunas para leptospirosis en ciertas especies, los animales muestreados no tenían antecedentes de vacunación contra la bacteria.

3.3. Determinación del tamaño muestral

El tamaño muestral para esta investigación se estimó por medio de la aplicación de Win Epi (Ortega et al., 2000), en donde este cálculo se lleva a cabo con los siguientes argumentos:

- 1) Tamaño de la población conocido o desconocido.
- 2) Prevalencia o proporción esperada para la enfermedad o evento de salud en estudio (en este caso, leptospirosis).
- 3) Un nivel de confianza establecido por los investigadores.

4) Un margen de error establecido por los investigadores.

Tomando en cuenta una casuística de 3 animales atendidos por mes en el Hospital Clínico Veterinario, Universidad San Sebastián, sede de la Patagonia y considerando un trabajo de campo de recolección de muestras de aproximadamente 6 meses, el tamaño de la población correspondió a 16 animales. Con una prevalencia esperada del 50,0%, un nivel de confianza del 95% y un margen de error del 10%, el tamaño muestral mínimo calculado fue de 14 animales, sin embargo, el estudio logró llegar a un tamaño muestral de 43 pacientes.

3.4. Obtención de las muestras de sangre

En los bovinos, ovinos, caprinos, para la recolección de aproximadamente 1 ml de sangre se realizó a partir de la vena yugular o la vena coccígea. En un brete acorde al tamaño del bovino, se posicionó el animal de pie y una persona realizó la inmovilización de la cabeza con un lazo. En el caso del ovino y caprino se hizo una maniobra para sentarlo y por dorsal del animal se sujetó los dos miembros anteriores. Seguidamente, la cabeza se estiró hacia un lado, para visualizar el surco yugular, en el caso de los bovinos se usó como opción la vena coccígea, al tener el paciente bien inmovilizado, otra persona procedió a recolectar la muestra de sangre con una jeringa de 3 ml y una aguja de 20 g. Cada muestra se distribuyó en un tubo sin aditivos (tapa roja), se mantuvo entre 4 y 6 °C entre 24 a 48 horas, luego se sometieron a centrifugación por 3 minutos para separar el suero de la sangre coagulada y se traspasaron 0,2 ml de suero en un tubo Eppendorf luego se almacenó a -20 °C hasta el momento de su análisis.

3.5. Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT)

Para determinar la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira*, identificar el serogrupo causante de las reacciones serológicas o la seropositividad y además identificar el título de anticuerpos (OIE, 2021), se realizó el método de Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT) (Faine et al., (1999); OMS y WHO-ILS, 2003). Este procedimiento consta de dos fases:

-Fase 1 (tamizaje o screening): se realiza mezclando el suero problema con un cultivo de *Leptospira* patógena y luego se evalúa el grado de aglutinación usando un microscopio de campo oscuro. Como punto de referencia, se considera un 50% de aglutinación.

-Fase 2 (determinación de los títulos de anticuerpos): para esta investigación se consideraron títulos de 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 y 1:1600.

Se utilizó un panel de ocho serogrupos/serovares de *Leptospira*: *Leptospira interrogans* serovars *Hardjo* (serogrupo *Sejroe*), *Pomona* (serogrupo *Pomona*), *Canicola* (serogrupo *Canicola*), *Icterohaemorrhagiae* (serogrupo *Icterohaemorrhagiae*), *Autumnalis* (serogrupo *Autumnalis*), y *Bratislava* (serogrupo *Australis*); *Leptospira borgpetersenii* serovar *Tarassovi* (serogrupo *Tarassovi*); y *Leptospira kirschneri* serovar *Grippotyphosa* (serogrupo *Grippotyphosa*).

Este análisis se realizó en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas del Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, se le solicitó una constancia la cual esta detallada en el anexo C.

El procedimiento de análisis para las muestras con la se describe en detalle en el anexo B.

3.6. Cálculo de la tasa de seropositividad

El cálculo de la tasa de seropositividad global y por especie animal (para bovinos, ovinos, caprinos y alpacas) fue realizado mediante la siguiente formula modificada por Dohoo et al., (2003).

$$P = \frac{A}{B}$$

Dónde:

A= Número de individuos que resultaron positivos a la prueba MAT.

B= Número de individuos muestreados.

Adicionalmente, se calcularon los Intervalos de Confianza del 95% (IC 95%) para las tasas de seropositividad, con la siguiente fórmula (Noordiuzen et al, 2017):

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

3.7. Análisis de los datos

Se obtuvieron datos sobre la seropositividad para *Leptospira* patógena en los animales muestreados, de acuerdo con la especie: bovinos, ovinos, caprinos y alpacas. Las posibles diferencias entre estas proporciones se analizaron mediante la prueba de Chi cuadrado con corrección de Yates, utilizando un valor p menor a 0,05 como significancia estadística (Romero, 2011).

A la vez, mediante la prueba MAT, se dilucidaron cuáles son los serogrupos detectados y los títulos de anticuerpos. Estos datos fueron agrupados de acuerdo con la especie animal y se realizó una distribución de frecuencias y estadística descriptiva. La determinación de la significancia estadística entre las diferencias de estas proporciones también se realizó con la prueba de Chi cuadrado con corrección de Yates.

Los análisis estadísticos se efectuaron por medio de las aplicaciones del programa EpiInfo versión 6.04.

3.8. Presentación de los resultados el estudio

Los resultados del estudio se presentaron mediante la construcción de tablas y gráficos con la frecuencia absoluta (número) y la frecuencia relativa (porcentajes), utilizando el programa Microsoft Excel.

3.9. Aspectos éticos

Este estudio está incluido en un proyecto de investigación (proyecto VRID_FAPPE 22-04, el cual fue aprobado por el Comité institucional para ética en el uso y cuidado de animales de la Universidad San Sebastián. El número de certificación es 015-22.

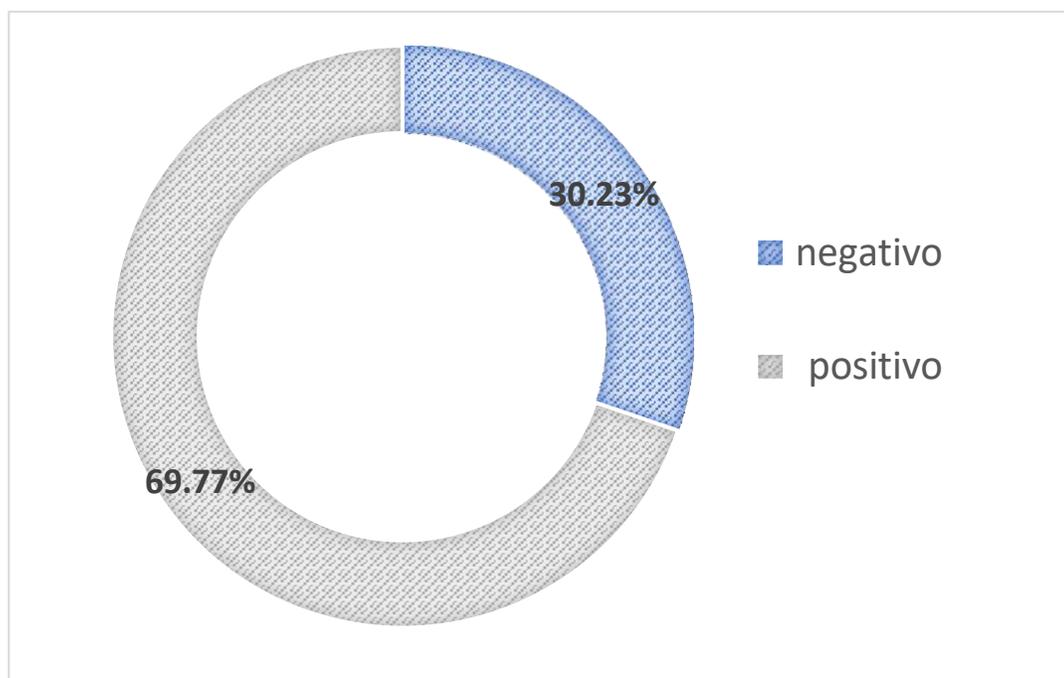
4. RESULTADOS

4.1 Tasa de seropositividad para *Leptospira patógena* en animales rumiantes utilizando la Prueba MAT como ensayo diagnóstico

Los animales rumiantes que se muestrearon en esta investigación pertenecen a dos diferentes familias de animales: *Bovidae* y *Camelidae*. De la familia *Bovidae* se muestrearon a 18 ovinos, 4 caprinos y 20 bovinos, y por parte de la familia *Camelidae* se muestreó a 1 alpaca (Tabla 1).

El tamaño muestral fue de 43 animales. Se detectaron anticuerpos de anti-*Leptospira* en 30 de las muestras, lo que corresponde a una tasa de seropositividad global de un 69,7% (IC 95% 56– 83,4) (Figura 1).

Figura 1 Distribución de la seropositividad a *Leptospira* patógena en rumiantes. Hospital Clínico Veterinario, Universidad San Sebastián, sede de la Patagonia. Diciembre año 2022 a junio año 2023. Puerto Montt, Región de Los Lagos.



Fuente: Elaboración propia, 2024.

De los 18 ovinos muestreados, 12 fueron positivos a *Leptospira* y 6 fueron negativos. De los 20 bovinos muestreados en el hospital, 17 muestras de esta especie dieron positivo y 3 dieron negativo. En los caprinos muestreados 1 de estos dio positivo a leptospirosis y 3 dieron negativo a anticuerpos anti-*Leptospira*. En el caso de la alpaca muestreada dio negativo a anticuerpos anti-*Leptospira*. En la tabla 1 se da a conocer los animales positivos con los animales negativos a leptospirosis divididos por especie con su respectiva tasa de seropositividad, destacando una mayor tasa en bovinos (85%; IC 95%= 69,3%-100%), seguido de los ovinos (66,7%; IC 95%= 45%-87%) y caprinos (25%; IC 95%= 0%-67,4%).

Tabla 1 Tamaño muestral de cada especie con la cantidad de muestras positivas y negativas a la prueba MAT con su respectiva tasa de seropositividad y su IC 95%. Hospital Clínico Veterinario, Universidad San Sebastián, sede de la Patagonia. Diciembre año 2022 a junio año 2023. Puerto Montt, Región de Los Lagos.

Especies	Tamaño muestral (N°)	N° positivos MAT	N° negativos MAT	Tasa de seropositividad (%)	IC 95%
Bovinos	20	17	3	85%	69,3-100%
Ovinos	18	12	6	66,7%	32,2-87%
Caprinos	4	1	3	25%	0-67,4%
Alpaca	1	0	1	0%	0%

Fuente: Elaboración propia, 2024.

Las diferencias entre las tasas de seropositividad por especie no fueron estadísticamente significativas (Valor $p > 0,05$).

4.2. Serogrupos más comunes de *Leptospira* patógena en el Hospital Clínico Veterinario.

Un total de 19 de los 30 animales seropositivos reaccionaron a más de tres serogrupos diferentes lo que implica que la mayoría de las muestras presentaron reacción cruzada a diferentes serogrupos.

De los ocho serogrupos que se analizaron se cuantificaron de mayor a menor. *Tarassovi* con 21 muestras reactivas, 14 pertenecientes a bovinos (82,3%) y 7 a ovinos con un 58,33% dentro de cada especie. El serogrupo que los siguió fue *Sejroe* con 6 muestras reactivas de las cuales 2 fueron de bovinos con una frecuencia de un 11,7%, 3 de ovinos con un 25% y 1 de caprino siendo el único positivo en caprinos dando el 100%, dentro de cada especie, por último, el otro serogrupo que tuvo muestras reactivas fue *Autumnalis* con 1 muestra de bovino positiva, entregando una frecuencia de un 5,8% y 2 de ovino con un 16,6%. Los serogrupos *Canicola*, *Pomona*, *Australis*, *Grippotyphosa* e *Icterohaemorrhagiae* no presentaron muestras reactivas (Tabla 2 y Figura 2).

Tabla 2 Número y porcentaje de muestras positivas para cada serogrupo de *Leptospira* patógena según especie animal. Hospital Clínico Veterinario, Universidad San Sebastián, sede de la Patagonia. Diciembre año 2022 a junio año 2023. Puerto Montt, Región de Los Lagos.

Serovares/serogrupos	Bovinos		Ovinos		Caprinos		Alpacas		Total	
	N° pos*	%	N° pos*	%	N° pos*	%	N° pos*	%		
<i>Sejroe</i> (Hardjo)	2	11,7	3	25	1	100	0	0	6	20
<i>Pomona</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Canicola</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Autumnalis</i>	1	5,8	2	16,6	0	0	0	0	3	10
<i>Australis</i> (Bratislava)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Tarassovi</i>	14	82,3	7	58,3	0	0	0	0	21	70
<i>Grippotyphosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coaglutinaciones	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	17	100	12	100	1	100	0	0	30	100

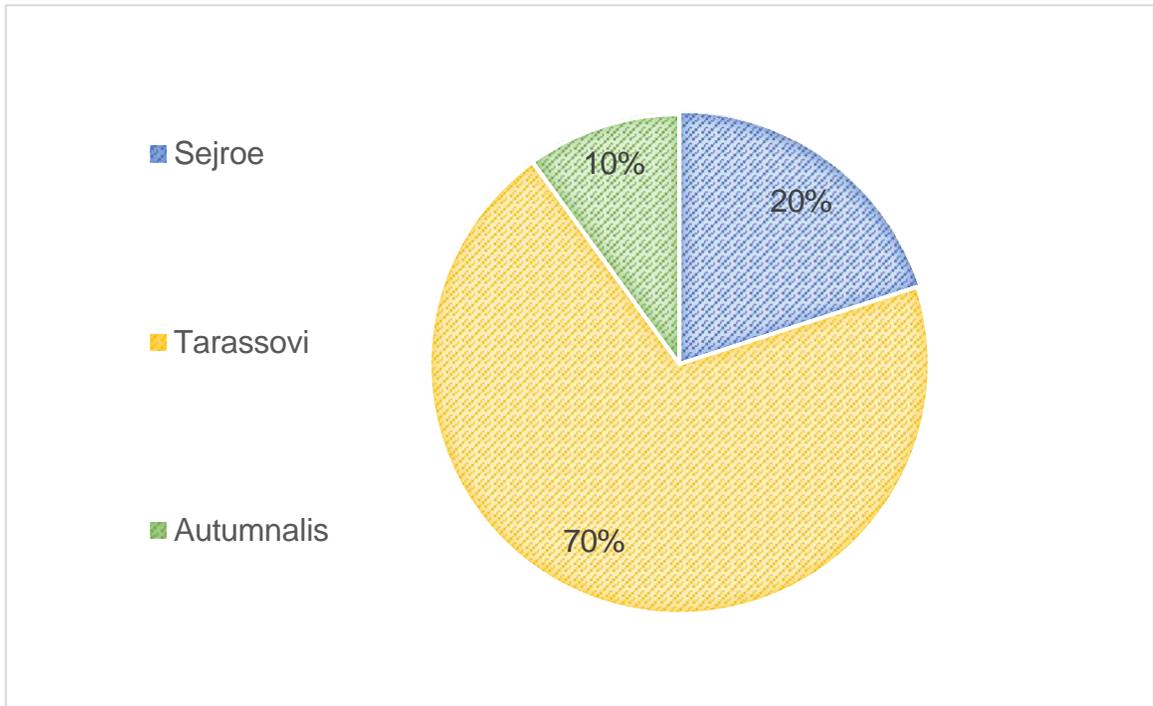
*N° pos: N° animales positivos a la prueba MAT.

Fuente: elaboracion propia, 2024.

Las diferencias entre las frecuencias de presentacion de animales seropositivos en bovinos y ovinos para cada uno de los serovarres/serogrupos no fueron estadisticamente significativas ($p > 0,05$). Sin embargo, al analizar los porcentajes totales para los rumiantes en general se encontró que las proporciones entre los serovares/serogrupos sí presentaron diferencias estadisticamentes significativas ($p < 0,05$).

Para todas las especies de animales rumiantes incluidas en el estudio, el serogrupo *Tarassovi* obtuvo la mayor cantidad de muestras reactivas (Tabla 2), con una frecuencia de un 70%, seguido de *sejroe* (20%) y *Autumnalis* (10%), *Canicola*, *Pomona*, *Australis*, *Grippotyphosa* e *Icterohaemorrhagiae* no presentaron número de muestras positivas por lo no tuvieron un porcentaje de frecuencia (Tabla 2 y figura 2).

Figura 2 Porcentaje de serogrupos en los rumiantes muestreados seropositivos a *Leptospira* patógena. Hospital Clínico Veterinario, Universidad San Sebastián, sede de la Patagonia. Diciembre año 2022 a junio año 2023. Puerto Montt, Región de Los Lagos.



Fuente: elaboración Propia, 2024.

4.3. Reactividad serológica y títulos de anticuerpos para serogrupos de *Leptospira* patógena utilizando la prueba MAT.

Los títulos de anticuerpos más bajos que se detectaron fueron 1:100 y el nivel más alto fue 1:1600. En bovinos el título de anticuerpos más frecuente fue 1:400 con un total de 6 muestras positivas (35,3%), seguido de títulos de 1:800 (29,4%) y 1:200 (23,5%). En el caso de los ovinos, el título de anticuerpos que más se repitió fue 1:400 con una cantidad de 5 muestras (47,1%), y otros títulos que se presentaron fueron 1:800 (25%) y 1:600 (16,7%) y en el caprino la muestra que dio positivo fue de 1:800 (100%). En las alpacas no se obtuvieron títulos de anticuerpos porque no hubo muestras positivas (Tabla 3).

Para todas las especies de animales rumiantes incluidas en esta investigación, los títulos de anticuerpos que predominaron en las muestras positivas fueron 1:400 (36,6%), 1:800 (30%) y 1:200 (16,6%) (Tabla 3 y figura 3).

Tabla 3 Número y porcentaje de títulos de anticuerpos en las muestras positivas a *Leptospira* patógena según especie animal. Hospital Clínico Veterinario,

Universidad San Sebastián, sede de la Patagonia. Diciembre año 2022 a junio año 2023. Puerto Montt, Región de Los Lagos.

Títulos de anticuerpos	Bovinos		Ovinos		Caprinos		Alpacas		Total	
	N° pos*	%	N° pos*	%	N° pos*	%	N° pos*	%		
1-100	1	5,9	1	8,3	0	0	0	0	2	6,6
1-200	4	23,5	1	8,3	0	0	0	0	5	16,6
1-400	6	35,3	5	41,7	0	0	0	0	11	36,6
1-800	5	29,4	3	25,0	1	100	0	0	9	30
1-1600	1	5,9	2	16,7	0	0	0	0	3	10
Total	17	100	12	100	1	100	0	0	30	100

*N° pos: N° animales positivos a la prueba MAT.

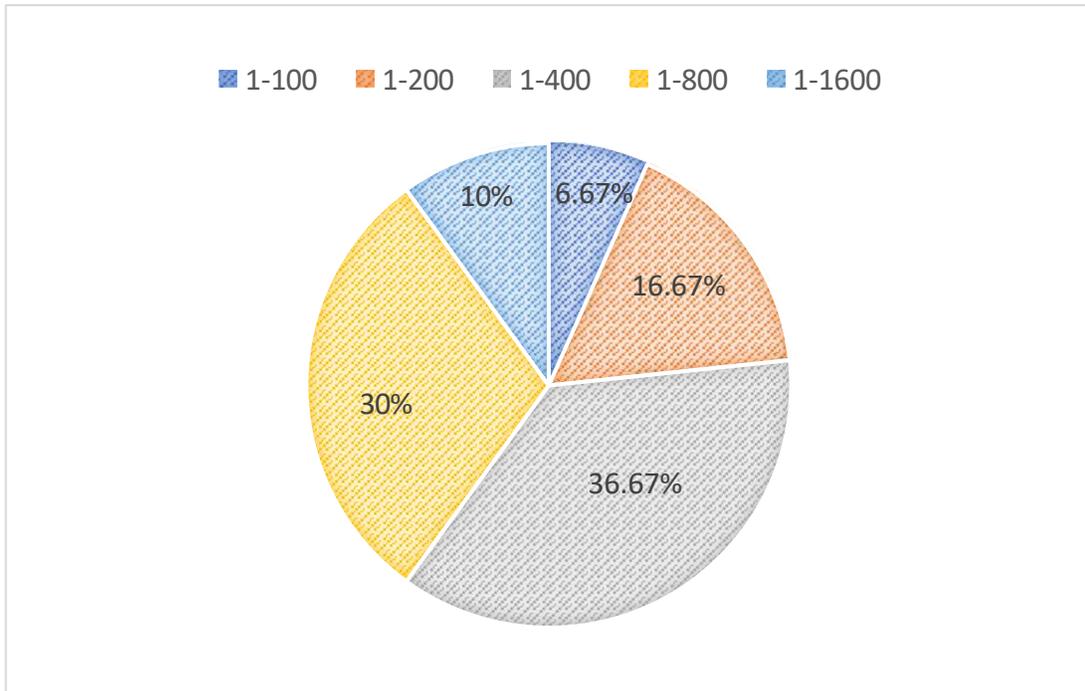
Fuente: elaboración Propia, 2024

Las diferencias entre las frecuencias de presentación de los serogrupos para cada especie y para rumiantes en general no fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

El título de anticuerpos con la mayor frecuencia de presentación fue 1:400 con un valor de 11 muestras dando como porcentaje 36,67%, lo siguió 1:800 con 9 muestras y una presentación del 30%, el título de anticuerpos 1:200 tuvo un porcentaje del 16,67%, por consiguiente, 1:1600 tuvo 3 muestras positivas con un porcentaje del 10% y, por último, 1:100 que tuvo 2 muestras dando una frecuencia del 6,67% (Tabla 4). A continuación, se muestra la distribución de frecuencias de los títulos de anticuerpos (Figura 3).

Figura 3 Distribución de frecuencias en porcentajes para los títulos de anticuerpos en los rumiantes muestreados seropositivos a *Leptospira* patógena.

Hospital Clínico Veterinario, Universidad San Sebastián, sede de la Patagonia.
Diciembre año 2022 a junio año 2023. Puerto Montt, Región de Los Lagos.



Fuente: elaboración Propia, 2024.

5. DISCUSIÓN

El presente estudio, tuvo como objetivo general detectar seropositividad a *Leptospira patógena* en rumiantes que fueron atendidos en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad San Sebastián, sede de la Patagonia de Puerto Montt, Región de Los Lagos, Chile durante el período de tiempo comprendido entre los meses de diciembre de 2022 a junio del año 2023.

Mediante la Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT) se demostró que, de 43 animales atendidos en el hospital, 30 tuvieron una exposición a *Leptospira spp* dando una tasa de seropositividad del 69,7%. De los 43 animales muestreados, 20 fueron muestras de bovino, 17 de estas fueron positivas. Un total de 18 de 43 muestras fueron de ovino de las cuales 12 muestras dieron positivo. Y, Por último, de las 43 muestras, 4 corresponden a caprino, 1 de estas dio positivo a *Leptospira spp*, resultando en tasas de seropositividad de 85%, 66,77% y 25% respectivamente por especie. En el caso de la alpaca solo fue una muestra la cual dio como resultado negativo.

De los estudios que se han hecho en Chile sobre leptospirosis solo Zamora et al. (1975), ha abarcado a diferentes rumiantes (bovinos, ovinos y caprinos), además de cerdos, caballos y perros domésticos, sin embargo, solo se estimó la prevalencia de rumiantes por separado, por lo que la tasa de seropositividad en rumiantes de este estudio (69,77%), no se puede comparar. Hasta la fecha, es la única investigación en Chile que ha establecido una prevalencia general de rumiantes (bovinos, ovinos y caprinos) en una zona específica.

En bovinos el resultado de la tasa de seropositividad para *Leptospira patógena* en animales rumiantes obtenido en este estudio es el valor más alto que se ha obtenido en rumiantes en Chile (69,77%). El valor más elevado que se había detectado hasta el momento era el de la investigación realizada por Salgado et al (2014), en el cual se muestrearon 79 rebaños de ganado bovino de pequeños predios lecheros en la región de los ríos de la zona sur de Chile. El estudio dio

como resultado que 52 rebaños fueron seropositivos, obteniendo una prevalencia del 75%.

En la especie ovina, de los dos estudios que se han publicado en Chile Zamora et al. (1975) y Zamora et al. (1999), obtuvieron prevalencias de 7,4% y 5,7% respectivamente, valores muy bajos comparados con la presente investigación (66,77% en ovinos).

En caprinos, la investigación de Zamora et al. 1975 dio como tasa de seropositividad un 24,8%, prevalencia muy parecida a la de este estudio (25% en caprinos).

En otros países existen estimaciones con diferentes tasas de seropositividad, como en Venezuela que se presentó una prevalencia en bovinos de 48% (Alfaro et al., 2004). En Medellín, Colombia, Ochoa, et al, (2000), obtuvo una prevalencia de 60,9% en bovinos. En México se realizó un estudio en diferentes regiones del país donde se determinó una prevalencia de 31,1% (Moles et al., 2002), Brasil en el estudio de De Almeida et al., (1988) se calculó una tasa de 53,3%. En Alemania, Schonberg et al., (1987) obtuvo una prevalencia de 2,4%. En Nigeria, Ochefije et al., (2012), determinó una tasa de 10,98%, En Bélgica, Desmecht, (1986), estimó una prevalencia de 9,9% y En Reino Unido Pritchard, (1986) obtuvo 34,4%. Todas las investigaciones citadas anteriormente fueron realizadas utilizando la prueba MAT, como ensayo diagnóstico Es posible observar que las tasas de prevalencia o de positividad son diferentes a las encontradas en la presente investigación, lo cual podría deberse a discrepancias en los paneles de serovares y serogrupos utilizados en la prueba MAT, cuya frecuencia de presentación difiere dependiendo de la región geográfica y la presencia de hospedadores de mantención en cada área, como también por los puntos de corte de los títulos de anticuerpos que se consideran en cada estudio para clasificar a los animales como positivos o negativos (OIE, 2021). Por otra parte, estos países tienen climas diferentes y se encuentran en diferentes áreas geográficas, lo que influye en la presentación de la leptospirosis y a esto se suman las diferencias en las características de los animales muestreados en

cuanto a edad, condiciones de mantenimiento o estado de vacunación antileptospiral.

Los serogrupos más comunes que se detectaron esta memoria de título fueron: *Tarassovi* con 21 muestras reactivas de las cuales 14 fueron muestras de bovino y 7 de caprinos. De *Hardjo* se obtuvieron 6 muestras de las cuales 2 fueron de bovino, 3 de ovino y 1 de caprino. Y de *Autumnalis*, hubo 3 muestras reactivas, de las cuales, 1 muestra fue de bovino y 2 de ovino. La especie que se le asocia *Tarassovi* es el cerdo, el jabalí ya que son sus hospedadores de mantención (Cilia et al. 2020) y animales silvestres como los zorros (*Lycalopex culpaeus* y *Lycalopex griseus*) ya que los ratones son partes de su dieta (Zamora y Riedemman, 1999), para rumiantes en general se le asocia *Hardjo* ya que son hospedadores de mantenimiento de este serogrupo (Ellis, 1994) el cual tuvo en este estudio 3 muestras reactivas a bovino 2 a ovino y 1 a caprino.

De los resultados obtenidos en este estudio, *Tarassovi* es el serogrupo con más exposiciones (70%), lo que se contrarresta con los otros estudios hechos en la zona sur de Chile, donde *Hardjo* y *Pomona* son los más frecuentes en los estudios de rumiantes (Azócar-Aedo, 2023). Balcázar et al, (2024), en su reciente estudio realizado en el centro de rehabilitación de fauna silvestre de la Universidad San Sebastián, Sede La Patagonia, en la ciudad de Puerto Montt, Región de Los Lagos, sur de Chile, detectó seropositividad a *Leptospira* en los animales silvestres que llegaban al centro, donde el serogrupo con mayor frecuencia fue *Tarassovi*, lo que puede estar indicando que en la zona sur de Chile hay un porcentaje no menor de serogrupo *Tarassovi* que este predominando de los otros.

Los títulos de anticuerpos 1:400 y 1:800 fueron los más comunes, el primero (1:400) tuvo 11 muestras, de estas 6 fueron de bovino y 5 de ovino. Y la segunda (1:800) tuvo 9 muestras reactivas al título de anticuerpos, de los cuales 5 fueron de bovino, 3 de ovino y 1 de caprino. Según la Faine et al, (1982), un título de anticuerpos de 1:100 ya es tomado como una exposición a la bacteria dada la alta especificidad de la prueba MAT. La OIE, (2021), también da a conocer que

un título de 1:100 aunque sea bajo, ya es considerado positivo. Los títulos de anticuerpos 1:400 o más altos en zonas endémicas y 1:100 o mayor título de anticuerpo, en zonas no endémicas, son catalogados casos clínicos de infección si el animal presenta sintomatología compatible (WHO, 2010). Por lo que en este estudio se obtuvo un mayor número de títulos de anticuerpos 1:400, además, lo que se puede decir que en el estudio al obtener la mayoría de los títulos de anticuerpos 1:400 y 1:800 (11 y 9 muestras respectivamente) y los animales al no presentar signos clínicos, pero si pertenecer a una zona endémica, no son casos de infección activa, pero si representan una exposición a *Leptospira spp.*

Dentro de las posibles limitaciones que podríamos encontrar en este estudio se encuentran la zona geográfica y el tamaño muestral relativamente reducido. Al ser muestras solo de animales atendidos en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad San Sebastián, aunque provengan de distintas zonas de la región de los lagos y al haber recolectado 43 muestras, no se puede decir que el estudio puede abarcar toda la zona de la región de Los Lagos, pero a partir de los resultados obtenidos se establece que existen animales rumiantes expuestos a la infección por *Leptospira* patógena.

Para estudios epidemiológicos futuros que se realicen en la zona sur de Chile se puede recomendar llevar a cabo diferentes métodos diagnósticos para *Leptospira spp.*, como, por ejemplo, PCR en muestras de orina, abarcando otras especies animales con zonas geográficas y tamaños muestrales más grandes para seguir ampliando el conocimiento de esta bacteria en nuestro país.

Por otra parte, es importante que los productores del sur de Chile adopten medidas de prevención para la leptospirosis, considerando sus consecuencias en salud y producción animal y su potencial zoonótico, como también su relevancia en salud pública.

Un aspecto importante de atención son los roedores, principales reservorios, en predios que incluyen una elevada densidad animal y con defectos en la integridad de las instalaciones, en donde se facilita la acumulación de deposiciones, y el uso de aguas no potables, ayudan en la diseminación y mantenimiento de la

infección. Por esto, son necesarias la implementación y puesta en marcha de buenas prácticas en el manejo del ganado para evitar el contagio y diseminación de esta enfermedad que puede ocasionar grandes problemas en la salud pública. La vacuna antileptospirósica generalmente es eficaz en la protección contra la infección letal, aunque esta protección es de limitada duración en el tiempo (Bautista et al, 2019).

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio confirman que los rumiantes atendidos en el Hospital clínico de la Universidad San Sebastián, Sede la Patagonia, de la Región de Los Lagos, Puerto Montt han estado expuestos a *Leptospira* patógena, obteniéndose una seropositividad de 69,7%, siendo hasta el momento la prevalencia más alta en estudios de rumiantes reportada en Chile. El serogrupo más diagnosticado en el Hospital Clínico veterinario fue Tarassovi, por lo que existe una alta probabilidad que los animales silvestres constituyan una importante fuente de infección y los títulos de anticuerpos predominantes fueron 1:400 y 1:800, lo que nos indica que hubo una exposición del agente patógeno. Se recomienda implementar medidas de prevención para *Leptospira spp* y la realización de estudios relevantes que puedan dilucidar la carga patógena y el daño económico y reproductivo que puede estar causando esta bacteria en rumiantes.

7. REFERENCIAS

- Adler, B. y de la Peña Moctezuma, A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary microbiology*, 140(3-4), 287-296. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
- Alfaro, C., Y. Aranguren, A. Clavijo y C. Díaz. (2004). Prevalencia serológica de Leptospirosis en ganado doble propósito del noreste de Venezuela. *Zootecnia tropical* 22 (2):117-132.
- Andre-Fontaine, G., Aviat, F., & Thorin, C. (2015). Waterborne Leptospirosis: Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic *Leptospira* spp. in Fresh Water. *Current Microbiology*, 71(1), 136–142. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0836-4>
- Azócar-Aedo, L. (2023). Basic Aspects and Epidemiological Studies on Leptospirosis Carried Out in Animals in Chile: A Bibliographic Review. En *Tropical Medicine and Infectious Disease* (Vol. 8, Número 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8020097>
- Azócar-Aedo, L. y Monti, G. (2022). Seroprevalence of pathogenic *Leptospira* spp. in domestic dogs from southern Chile and risk factors associated with different environments. *Preventive Veterinary Medicine*, 206, 105707. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2022.105707>
- Azócar-Aedo, L., Monti, G. y Jara, R. (2014). *Leptospira* spp. in domestic cats from different environments: prevalence of antibodies and risk factors associated with the seropositivity. *Animals*, 4(4), 612–626. <https://doi.org/10.3390/ani4040612>
- Balcázar, L.; Azócar-Aedo, L.; Barrera, V.; Meniconi, G.; Muñoz, V.; Valencia-Soto, C. (2024) Detection of Antibodies for Pathogenic *Leptospira* in Wild Mammals and Birds from Southern Chile—First Record of Seropositivity in a

Guiña (Leopardus guigna). *Animals*, 14, 601.
<https://doi.org/10.3390/ani1404060>

Bautista T. MVZ, Brayan Raul, Bulla C. MVZ, Diana María, López B. Zootec, Henry Alexander, Díaz A. MVZ, Adriana María, & Pulido M. M.Sc., Martín Orlando. (2019). Leptospirosis: enfermedad de importancia en salud pública. *Revista colombiana de ciencia animal recia*, 11(2), 108-118. Epub May 09, 2020. <https://doi.org/10.24188/recia.v11.n2.2019.727>

Center for Diseases Control (CDC) (2023). Epi Info en español. Disponible en https://www.cdc.gov/epiinfo/esp/es_index.html

De Almeida S.C., Moreira E.C., Gomes A.G., Vale C. (1988). infección por leptospira interrogans, numa fazenda de minas gerais, brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*; 40: 137-144.

Desmecht, M. (1986). Importance of leptospirosis in Belgium. In: Ellis W.A. y Little T.W.A. (Eds.) *The Present state of leptospirosis diagnosis and control*. Martinus Nijhoff Publishers, 1986; pp. 197- 203.

Dohoo, I. R., Martin, W., & Stryhn, H. E. (2003). *Veterinary epidemiologic research*. University of Prince Edward Island.

Ellis, W. A. (1994). Leptospirosis as a Cause of Reproductive Failure. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 10(3), 463–478. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30532-6](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30532-6)

Faine, S., Adler, B., Bolin, C. y Perolat, P. (1999). *Leptospira and leptospirosis* (1a ed.). Medisci Press.

Faine, S & World Health Organization. (1982). *Guidelines for the control of leptospirosis* / edited by S. Faine. World Health Organization. <https://iris.who.int/handle/10665/37219>

Haji Hajikolaei, M. R., Rezaei, S., Ghadrddan Mashhadi, A. R., & Ghorbanpoor, M. (2022). The role of small ruminants in the epidemiology of leptospirosis. *Scientific Reports*, 12(1), 2148. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05767-x>

- Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., & Baptista Lucio, P. (2011). - Metodología de la investigación (sexta edición). Mc Graw Hill educación.
- Li, H., Ling, F., Zhang, S., Liu, Y., Wang, C., Lin, H., Sun, J., & Wu, Y. (2022). Comparison of 19 major infectious diseases during COVID-19 epidemic and previous years in Zhejiang, implications for prevention measures. *BMC Infectious Diseases*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07301-w>
- Loureiro, A. P., & Lilenbaum, W. (2020). Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. *Theriogenology*, 141, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.011>
- Martins, G., Brandão, F. Z., Hamond, C., Medeiros, M., & 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., & Lilenbaum, W. (2014). Leptospirosis in sheep and goats under tropical conditions. *Tropical Animal Health and Production*, 46(1), 11–17. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0480-6>
- Martins, G., & Lilenbaum, W. (2015). Comments of Environmental Conditions for the Maintenance of *Leptospira* in Tropical Scenarios. *Current Microbiology*, 71(5), 624–625. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0894-7>
- Moles Cervantes, L. P., Cisneros Puebla, M. A., Rosas, D. G., Serranía, N. R., & Torres Barranca, J. I. (2002). Estudio serológico de leptospirosis bovina en México Serological study of bovine leptospirosis in Mexico. *Revista cubana de medicina tropical*, 54(1), 24–27.
- Monahan, A. M., Callanan, J. J., & Nally, J. E. (2009). Review paper: Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. *Veterinary Pathology*, 46(5), 792–799. <https://doi.org/10.1354/vp.08-VP-0265-N-REV>

- Montes, V., & Monti, G. (2021). Pathogenic leptospira spp. Seroprevalence and herd-level risk factors associated with chilean dairy cattle. *Animals*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/ani11113148>
- Mughini-Gras, L., Bonfanti, L., Natale, A., Comin, A., Ferronato, A., La Greca, E., Patregnani, T., Lucchese, L., & Marangon, S. (2014). Application of an integrated outbreak management plan for the control of leptospirosis in dairy cattle herds. *Epidemiology and infection*, 142(6), 1172–1181. <https://doi.org/10.1017/S0950268813001817>
- Ngbede, E. O., Raji, M. A., Kwanashie, C. N., Emmanue, Okolocha, C., Maurice, N. A., Akange, E. N., & Odeh, L. E. (2012). Leptospirosis among zebu cattle in farms in kaduna state, nigeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2(5), 367–369. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(12\)60080-2](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60080-2)
- Ochoa, J., A. Sánchez e I. Ruíz. (2000). Epidemiología de la leptospirosis en una zona andina de producción pecuaria. *Rev. Panam. Salud Pública*, 7(5):325-331.
- OIE. (2021). Capítulo 3.01.12. Leptospirosis. En *Manual Terrestre de la IOE*. https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.12_Leptospirosis.pdf
- Ortega, C., de Blas, I., Simón, M. C., Gironés, O., García, J., Alonso, J. L., Muzquiz, J. L., & Ruiz, I. (2000). Programa informático aplicado al estudio temporal de procesos patológicos en poblaciones animales. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 19(3), 735–743. <https://doi.org/10.20506/rst.19.3.1245>
- Picardeau, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et maladies infectieuses*, 43(1), 1-9. Elsevier Masson. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.11.005>
- Pritchard, D. G. (1986). National situation of leptospirosis in the United Kingdom. In: Ellis W.A., Little T.W.A. (Eds.) *Present state of leptospirosis diagnosis and control*. Martinus Nijhoff Publishers, pp. 221-233.

- MINSAL. Subsecretaria De Salud Pública (2020): Decreto 7, Reglamento sobre Notificación de Enfermedades Transmisibles de Declaración Obligatoria y su Vigilancia. Biblioteca del Congreso Nacional En: <http://bcn.cl/2f92r>
- Noordhuizen, J., Frankena, K., Van der Hoofd, C., Graat, E. (1997). Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology (1a ed.). Wageningen Pers.
- Romero, M. (2011). La prueba chi-cuadrado o ji-cuadrado (x²). *Enfermería del Trabajo*. 1(1):31-38.
- Schönberg, A., Staak, C., & Kämpe, U. (1987). Leptospirose in der Bundesrepublik Deutschland. Ergebnisse eines Untersuchungsprogrammes auf Leptospirose bei Tieren im Jahre 1984 [Leptospirosis in West Germany. Results of a research program on leptospirosis in animals in the year 1984]. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B*, 34(2), 98–108.
- Salgado, M., Otto, B., Sandoval, E., Reinhardt, G., & 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(1), 126. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-126>
- Suepaul, S. M., Carrington, C. v., Campbell, M., Borde, G., & Adesiyun, A. A. (2011). Seroepidemiology of leptospirosis in livestock in Trinidad. *Tropical Animal Health and Production*, 43(2), 367–375. <https://doi.org/10.1007/s11250-010-9698-8>
- Sykes, J. E., Haake, D. A., Gamage, C. D., Mills, W. Z., & 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>

- Tomckowiack, C., Matamala, S., León, C., Moroni, M., & Salgado, M. (2022). Detection of pathogenic leptospira as a cause of abortion in cattle-observations on diagnosis. *Austral journal of veterinary sciences*, 54(2), 77–81. <https://doi.org/10.4067/S0719-81322022000200077>
- World Health Organization. (2010). Report of the First Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group. World Health Organization.
- WHO-ILS. (2003). Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. ISBN: 924154589 5. NLM classification: WC 420.
- Zamora, J., Kruzey, J., & Riedemann, S. (1975). Leptospirosis de los Animales Domésticos en el Sur de Chile. Estudio Serológico. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, 22(7), 544–555. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1975.tb00622.x>
- 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://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X1999000200001>

8. ANEXOS

Anexo A

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

Fase 1: screening:

Primera parte:

- 1) Rotular los tubos de ensayo con el número de la muestra a analizar (muestra a analizar = suero problema).
- 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 (para hacer los controles):

- 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: lectura

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

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

- Si la gota suero problema- serovar tiene menos leptospiras que la gota control suero fisiológico- serovar, la muestra suero problema se considera “positiva” (tiene anticuerpos anti- *Leptospira*) Nota: puede ocurrir que un suero problema sea positivo a varios serovares.

Fase 2: titulación

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

Lo que se explica a continuación, sólo es válido para un solo serovar. Si por ejemplo, el suero da positivo a dos serovares, se deberá hacer dos veces lo explicado.

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 screening y titulación, los tubos se descartan en hacia un envase que contiene una dilución de agua y cloro, posteriormente se lavan y se autoclavan para ser reutilizados.

Anexo B

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Fecha: _____

Yo, _____, RUT _____
_____, autorizo la extracción de una muestra de sangre del rumiante
identificado como _____.

Especie: _____ y de _____ de edad.

El procedimiento en cuestión será para realizar el diagnóstico de seropositividad a *Leptospira patógena* en animales rumiantes atendidos en la Universidad San Sebastian Sede la Patagonia, mediante la prueba de diagnóstico MAT (Prueba de Aglutinación Microscópica). Este procedimiento será parte del proyecto para optar al título de médico veterinario del estudiante Mauricio Uribe Soto. El proyecto tiene como título **“ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO SOBRE LEPTOSPIROSIS EN RUMIANTES ATENDIDOS EN EL HOSPITAL CLINICO VETERINARIO DE LA UNIVERSIDAD SAN SEBASTIAN, SEDE DE LA PATAGONIA”**. El objetivo principal de este estudio es determinar la seroprevalencia de *Leptospira patógena* en los pacientes que acudan a el hospital clínico, por esto, los resultados que sean obtenidos en este proyecto se utilizaran solamente con fines académicos.

Firma tutor

Correo electrónico tutor:

Anexo C



Universidad Austral de Chile

Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria

CONSTANCIA



Dr. Miguel Salgado A., Académico del Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile, tiene a bien apoyar a la Dra. Lucía Isabel Azócar Aedo, Rut: 15.269.246-3 en el servicio diagnóstico en el marco de la propuesta de investigación titulada “Detección de leptospiras patógenas en animales domésticos y silvestres, atendidos en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad San Sebastián, Sede Patagonia, Puerto Montt Chile”.

De forma específica, nuestro laboratorio analizará más de 400 muestras de suero sanguíneo (de caninos, bovinos, felinos, ovinos, carprino, equinos y algunas especies silvestres) mediante la técnica MicroMAT para detección de anticuerpos anti-leptospiras patógenas.

Se compromete el presente apoyo diagnóstico para el período comprendido entre los meses de marzo a junio de 2023.

Se extiende la presente constancia para apoyar la postulación de la línea de investigación de la Dra. Azócar.

VALDIVIA, diciembre 01, 2022

