

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



*Tesis presentada para acceder al grado académico de
Doctora en Ciencias Veterinarias*

EVALUACIÓN DEL RIESGO DE
LEPTOSPIROSIS EN ASENTAMIENTOS
MARGINALES RIBEREÑOS DE SANTA FE,
ARGENTINA, MEDIANTE UN ENFOQUE
“UNA SALUD”

Autora:

Lic. Tamara RICARDO

Directora:

Dra. M. Andrea PREVITALI

Codirector:

Dr. Pablo M. BELDOMÉNICO

DPTO. DE CS. NATURALES, FACULTAD DE HUMANIDADES Y CIENCIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

-2018-

Vete, pues, hay otros mundos aparte de este...

Stephen King, La Torre Oscura

AGRADECIMIENTOS

- A mi directora Dra. Andrea Previtali por guiarme durante mi doctorado, proveerme del lugar de trabajo, brindarme su colaboración y apoyo e introducirme al mundo de la ecoepidemiología.
- A mis codirectores, Dres. Pablo Beldoménico y Bibiana Vanasco por facilitar el acceso a los laboratorios y por el apoyo científico-técnico.
- Al Dr. Lucas Monje, del Laboratorio de Biología Molecular del LEcEn, por la colaboración prestada en la determinación molecular de presencia de leptospiras patógenas.
- Al personal del Laboratorio de Leptospirosis del INER, Mg. Yosena Chiani, Bioq. Noelia Landolt, Bioq. Fernanda Schmeling, Mg. Paulina Jacob y Bioq. Nazarena Pujato, por la colaboración prestada en las determinaciones serológicas, tipificación molecular y acceso a las bases de datos epidemiológicas.
- A los Dres. Pablo Teta, del Museo Argentino de Cs. Naturales “Bernardino Rivadavia” y Agustina Ojeda del Grupo de Investigaciones de la Biodiversidad (GIB), IADIZA, por su colaboración en la identificación de especies de roedores mediante análisis del cráneo y técnicas moleculares.
- A los Dres. Raúl Macchiavelli y Pedro Torres, de la Universidad de Puerto Rico, por el apoyo estadístico recibido y la buena predisposición en responder mis consultas.
- Al “Lepto-team” (Laura Bergero, Sofía Nóbili, Cintia Palavecino, Franco Abatilli, Marcelo Gamboa, José Mancilla, Eric Riera, Guillermo Ursini, Jonatan Vega y Cristian Walker), Julieta Passegi, Paola D’Imperio y Leandro “Tato” Antoniazzi, que con su participación hicieron posibles los muestreos.
- A los encargados de la Isla Berduc, Club Santafesino de Caza y Pesca, Camping Río Hermoso, Camping El Camalote, a la familia Jaime y a “Don Carlos” por facilitarnos el espacio para la realización de los muestreos.
- Al CONICET por brindar el apoyo económico para la realización del doctorado.
- A la UNL por proveer subsidios para cubrir los gastos de investigación.

ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas y símbolos	VII
Resumen	IX
Abstract	X
Introducción general	1
Microbiología	1
Taxonomía y clasificación	3
Ciclo de vida y persistencia en el ambiente	4
Hospedadores	5
Manifestaciones clínicas y diagnóstico	8
Situación de leptospirosis en Argentina y el mundo	9
Objetivos	12
Capítulo 1: Vigilancia epidemiológica de leptospirosis en la provincia de Santa Fe	13
Introducción	14
Materiales y métodos	15
Área de estudio	15
Definición de casos	15
Fuentes de datos	15
Análisis de datos	17
Resultados	18
Casos de leptospirosis, factores demográficos y variables ambientales	18
Asociación entre casos de leptospirosis y variables ambientales	20
Distribución espacial de casos de leptospirosis	21
Discusión	21
Capítulo 2: Conocimientos, actitudes y prácticas (CAP) sobre leptospirosis en residentes de asentamientos marginales ribereños de Santa Fe	24
Introducción	25
Materiales y Métodos	26

Sitios de estudio	26
Recolección de datos	27
Scores de CAP	29
Análisis de datos	31
Resultados	32
Características socio-demográficas	32
Conocimientos, actitudes y prácticas	32
Factores que influyen sobre las prácticas preventivas	36
Discusión	37

Capítulo 3: Evaluación de la presencia de leptospiras patógenas en roedores silvestres y sinantrópicos **43**

Introducción	44
Materiales y métodos	45
Sitios de estudio	45
Muestreo de micromamíferos	45
Detección de leptospiras patógenas por métodos directos	47
ELISA	49
Tipificación	49
Análisis de datos	50
Consideraciones éticas	51
Resultados	51
Comunidad de micromamíferos	51
Prevalencia de leptospiras patógenas	53
Factores que influyen sobre la probabilidad de infección	54
Discusión	55

Capítulo 4: Evaluación de la presencia de leptospiras en fuentes de agua ambiental **59**

Introducción	60
Materiales y métodos	61
Sitios de estudio	61
Recolección y procesamiento de muestras	61
Cultivo	62
Real-time PCR	64
Identificación de leptospiras	64
Análisis de datos	65
Resultados	65
Discusión	67

Conclusiones	69
Bibliografía	71
Información suplementaria	99
Publicaciones	113

ÍNDICE DE TABLAS

1.1	Comparación de modelos univariados para analizar asociación entre variables climáticas y casos mensuales de leptospirosis, controlando por variación estacional (GLM binomial negativo con término de Fourier) . . .	20
2.1	Frecuencias (%) de características socio-demográficas y estado de evacuación de los encuestados (n = 113)	33
2.2	Frecuencia (%) de actitudes acerca de leptospirosis entre los encuestados que oyeron hablar sobre la enfermedad (n = 94)	35
2.3	Lista de modelos lineales mixtos candidatos a explicar la variabilidad en el score de prácticas, usando sitio como intercepto aleatorio (n = 92) . . .	37
2.4	Estimación de parámetros para los coeficientes del modelo más parsimonioso del score de prácticas con sitio como intercepto aleatorio (n = 92)	38
3.1	Seroprevalencia (%) de leptospiras patógenas en roedores múridos y sigmodontinos (n = 101) de asentamientos marginales ribereños, Santa Fe, Argentina (Sep-Oct 2014; Mar-Abr 2015; Sep-Oct 2015)	54
3.2	Comparación de modelos univariados para evaluar asociación entre variables climáticas y seropositividad en roedores (GLMM binomial, con sitio como efecto aleatorio)	55
4.1	Características físico-químicas de las muestras de agua según tipo de fuente, Santa Fe, Argentina (Mayo 2016)	66
S1	Clasificación genotípica del género <i>Leptospira</i>	100
S2	Serogrupos patógenos asociados a múltiples genomoespecies de <i>Leptospira</i> .	101
S3	Cuestionario utilizado para la encuesta de conocimientos, actitudes y prácticas (CAP)	104
S4	Frecuencias (%) de prácticas y situaciones de riesgos evitadas por los encuestados, según sexo (n = 113)	109
S5	Estimación de parámetros para los coeficientes del modelo más parsimonioso del score de prácticas para la muestra completa (Modelo 1) y para mayores de 18 años (Modelo 2)	110

S6	Comparación de modelos multivariados para evaluar asociación entre características del roedor (especie, sexo, edad, BCS, presencia de mordeduras), variables climáticas y seropositividad en roedores (GLMM binomiales, con sitio como efecto aleatorio)	112
----	--	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

1	Microfotografías de <i>Leptospira</i> spp	2
2	Clasificación de genomoespecies de <i>Leptospira</i>	4
3	Ciclo de transmisión de la leptospirosis	6
4	Distribución de casos de leptospirosis por provincia, Argentina (2011-2017)	11
1.1	Área de estudio	16
1.2	Variación temporal de casos de leptospirosis en la provincia de Santa Fe, Argentina (2010-2017)	19
1.3	Tasa de incidencia y riesgo relativo de leptospirosis por departamento, provincia de Santa Fe, Argentina.	22
2.1	Mapa de inundaciones mostrando los sitios de estudio	28
2.2	Sitios de estudio al momento de la encuesta	30
2.3	Conocimientos acerca de leptospirosis entre los encuestados que habían oído hablar sobre la enfermedad (n = 94)	34
2.4	Actividades de riesgo evitadas según sexo de los encuestados (n = 113) . .	36
3.1	Sitios de estudio	46
3.2	Procesamiento de micromamíferos	48
3.3	Similitudes en la comunidad de micromamíferos entre sitios	52
4.1	Sitios de estudio	62
4.2	Tipos de ambiente muestreados, Santa Fe, Argentina (2014-2016)	63
4.3	Frecuencia de muestras de agua ambiental según tipo de ambiente, Santa Fe, Argentina (Oct. 2014/Mayo 2016)	66
S1	Componentes de la serie temporal de casos mensuales de leptospirosis, Santa Fe, Argentina (2010-2017)	102
S2	Mapas de ambientes y población rural de Santa Fe	103
S3	Folleto informativo distribuido a los participantes de la encuesta	108
S4	Análisis de residuales del modelo más parsimonioso para explicar la variación en el score de prácticas (n = 92)	110
S5	Correlación entre variables climáticas utilizadas en el análisis univariado para explicar seropositividad a leptospiras patógenas en roedores sigmodontinos, Santa Fe (2014-2015)	111

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

- ADN** Ácido desoxirribonucleico
- AIC** Criterio de información de Akaike
- AICc** Criterio de información de Akaike de segundo orden
- ANOVA** Análisis de la varianza
- Antígeno TR** Antígeno termorresistente
- BCS** *Body condition score* (Score de condición corporal)
- CAAT** Test de absorción y aglutinación cruzada
- CAP** Conocimientos, actitudes y prácticas
- °C** Grados centígrados
- dNTP** Dideoxinucleótidos
- ELISA** Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
- EMJG** Ellinghausen-McCullough modificado por Johnson-Harris
- GLMM** Modelos lineales generalizados mixtos
- IgG, IgM** Inmunoglobulinas G y M
- IQR** Rango intercuartil
- INLA** *Integrated Nested Laplace Approximation*
- IRR** *Incidence rate ratio* (razón de tasas)
- LAMP** Amplificación isotérmica mediada por bucle
- LMM** Modelos lineales mixtos
- LogLik** Log-verosimilitud
- M** Molar
- MAT** Test de microaglutinación

ML Máxima verosimilitud

NTU Unidad nefelométrica de turbidez

OR *Odds ratio* (razón de probabilidades)

pb Pares de bases

PBS *Phosphate Buffered Saline* (Buffer fosfato salino)

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

REML Máxima verosimilitud restringida

rpm Revoluciones por minuto

SD Desviación estándar

SIVILA Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica por Laboratorios de Argentina

TR Aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente

xg Fuerza centrífuga

RESUMEN

La leptospirosis es una zoonosis causada por espiroquetas del género *Leptospira*, que se excretan con la orina de mamíferos infectados, pudiendo persistir semanas en ambientes húmedos. Esta enfermedad es endémica en la provincia de Santa Fe, con brotes epidémicos durante inundaciones. El objetivo de este trabajo fue obtener una visión integrada de la problemática de leptospirosis en Santa Fe, incorporando aspectos de salud humana, animal y ambiental. Se observó una marcada estacionalidad en los casos de leptospirosis humana, aumentando en función de las precipitaciones, con mayor riesgo relativo en departamentos situados en áreas inundables. A nivel individual, la adopción de prácticas riesgosas fue mayor en hombres y en aquellos con escaso conocimiento sobre la enfermedad. Respecto a salud animal, se detectaron anticuerpos anti-*Leptospira* en los roedores nativos *Akodon azarae*, *Holochilus chacarius*, *Oligoryzomys* spp. y *Scapteromys aquaticus*. En esta última especie, además se encontraron leptospiras en tejido renal de un ejemplar, indicando que se trata de un potencial reservorio. En una muestra ambiental, se detectó *Leptospira meyeri* en agua estancada, esta especie cuenta con cepas patógenas y no patógenas. Los resultados sugieren que existiría circulación de leptospiras en roedores nativos y muestras ambientales, lo cual podría incrementar las probabilidades de infección en áreas vulnerables a inundaciones. Los resultados además sugieren, que incrementar el conocimiento sobre leptospirosis mediante políticas de salud pública, contribuiría a reducir el riesgo de infección.

ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonotic disease caused by *Leptospira* spirochetes, which are excreted in the urine of infected mammalian hosts and can persist for weeks in the environment. Leptospirosis is endemic in the province of Santa Fe, registering epidemic outbreaks following flooding events. The aims of this work were to obtain an integrated measure of overall risk of leptospirosis, considering aspects of animal, human and environmental health. Human cases of leptospirosis showed high seasonality, being positively associated with precipitation. Relative risk of infection was higher in departments located in floodable areas. At the individual level, the adoption of risky practices was greater in men and in those with little knowledge about leptospirosis. Regarding animal health, antibodies against *Leptospira* were detected in the native rodents *Akodon azarae*, *Holochilus chacarius*, *Oligoryzomys* spp. and *Scapteromys aquaticus*. In the latter species, leptospires were also found in renal tissue of one individual, which would indicate that is a potential animal reservoir. In the environmental samples, *Leptospira meyeri*, a species with both pathogenic and saprophytic strains, was isolated from one sample of puddle water. The results obtained suggest that leptospires could be circulating in both native rodents and environmental sources, increasing the probability of infection in floodable areas. The results also suggest, that increasing the knowledge about leptospirosis through public health policies would contribute to reduce the risk of infection.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial causada por espiroquetas del género *Leptospira* (Levett, 2001; Bharti y col., 2003; WHO, 2003; Ko y col., 2009). La enfermedad se describió por primera vez en 1886 bajo el nombre de síndrome de Weil (Weil, 1886), aunque se sospecha que afectó durante miles de años a trabajadores rurales en China, Japón y Europa (Ko y col., 2009; Adler, 2015). En 1907, se detectaron espiroquetas en el tejido renal de un paciente fallecido por fiebre amarilla (Stimson, 1907). En 1915, grupos independientes de investigadores en Japón (Inada y col., 1916) y Alemania (Hubener, 1915; Uhlenhuth y Fromme, 1915) aislaron espiroquetas en muestras de pacientes con síndrome de Weil. Los investigadores japoneses, además, describieron aspectos epidemiológicos de la enfermedad y propusieron a ratas y ratones como animales reservorio (Inada y col., 1916; Ido y col., 1917). En las décadas subsiguientes, se aislaron leptospiras patógenas de perros (Klarenbeek y Schüffner, 1933), vacas (Semskov, 1940) y otros mamíferos domésticos, y se describió el rol de los mismos como hospedadores de leptospiras (Adler, 2015).

Tradicionalmente, la leptospirosis estuvo asociada a climas tropicales, subtropicales y zonas rurales, donde las condiciones ambientales favorecen la transmisión (Levett, 2001; Bharti y col., 2003; Reis y col., 2008; Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). Sin embargo, actualmente la leptospirosis representa un problema de salud pública a nivel mundial. Esto se debe a factores socio-económicos, climáticos y ambientales, que favorecieron la proliferación de la enfermedad en áreas urbanas de países desarrollados y en vías de desarrollo (Levett, 2001; Bharti y col., 2003; Vijayachari y col., 2008; Torgerson y col., 2015).

MICROBIOLOGÍA

Las leptospiras son bacterias helicoidales con extremos en forma de gancho (Fig. 1), tienen una longitud de entre 6 y 25 μm y entre 0.1-0.2 μm de diámetro, son aerobias obligatorias, patógenas o de vida libre (Levett, 2001; Ko y col., 2009; Adler y de la Peña Moctezuma, 2010; Cameron, 2015). Pueden sobrevivir en temperaturas entre 4-40°C, pH entre 5.5-7.6 y en suelos con un porcentaje de humedad superior al 20% (Gordon Smith y Turner, 1961; Khairani-Bejo y col., 2004; Saito y col., 2013a; Andre-Fontaine y col., 2015). Su crecimiento óptimo es a temperaturas entre 28-30°C y pH entre 7.2 y 7.6 (Bhar-

ti y col., 2003; Cameron, 2015). Son bacterias extremadamente móviles, se desplazan con rapidez en ambientes viscosos y conservan la movilidad ante cambios en la osmolaridad (Trueba y col., 2004; Takabe y col., 2013). Estas características, favorecerían la persistencia en el ambiente y la invasión de los tejidos del hospedador (Khairani-Bejo y col., 2004; Trueba y col., 2004; Chadsuthi y col., 2010; Cameron, 2015). La movilidad está dada por un axostilo, consistente en dos flagelos periplasmáticos con inserciones polares subterminales y extremos libres dirigidos hacia la mitad de la célula (Bharti y col., 2003; Adler y de la Peña Moctezuma, 2010; Cameron, 2015). Por su forma alargada y su movilidad, las leptospiras se observan mejor en microscopios de campo oscuro de fluorescencia (Fig. 1), o de contraste de fases (Cameron, 2015).

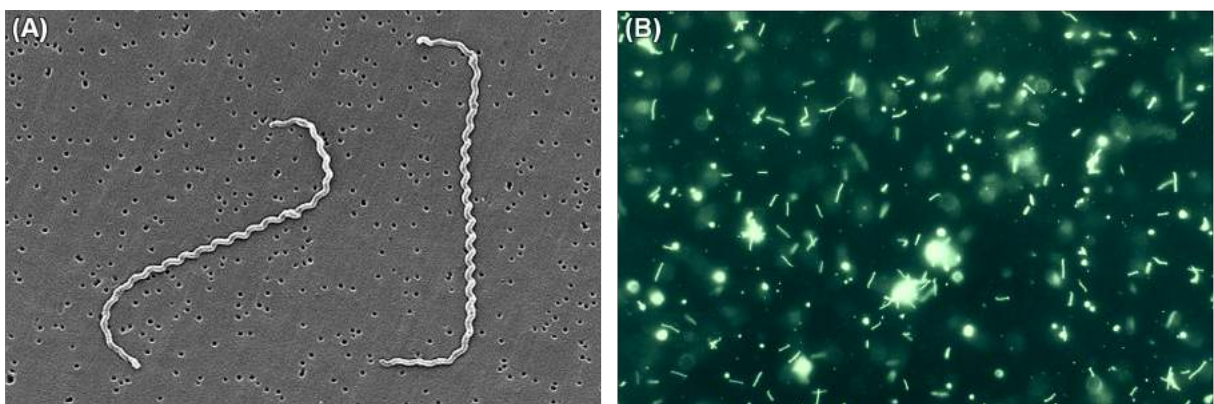


Figura 1. Microfotografías de *Leptospira* spp. (A) Microfotografía en microscopio electrónico de barrido, mostrando la ultraestructura de *Leptospira*; (B) Microfotografía en microscopio de campo oscuro de fluorescencia, mostrando los resultados de un test de microaglutinación (MAT). Fuente: [Public Health Image Library \(PHIL\)](#), [Centers for Disease Control and Prevention \(CDC\)](#).

El genoma de *Leptospira* consiste en dos cromosomas circulares de mayor tamaño que en otras espiroquetas, lo cual podría explicar su capacidad de adaptarse a distintos ambientes (Levett, 2001; Bharti y col., 2003; Haake y Matsunaga, 2010). La membrana celular presenta la estructura general de una bacteria Gram-negativa, con una membrana externa en donde se inserta el lipopolisacárido (LPS), una membrana citoplasmática, y un espacio periplasmático que contiene al peptidoglicano (Cameron, 2015). A diferencia de otras espiroquetas, el peptidoglicano está asociado a la membrana citoplasmática, haciendo que la membrana externa sea fluida y lábil, y el LPS se encuentra en la superficie, influyendo sobre la virulencia (Haake, 2000; Vijayachari y col., 2008; Adler y de la Peña Moctezuma, 2010; Haake y Matsunaga, 2010; Cameron, 2015).

TAXONOMÍA Y CLASIFICACIÓN

Las leptospiras pertenecen al orden Spirochaetales, familia Leptospiraceae, que incluye a los géneros *Leptospira*, *Leptonema* y *Turneriella* (Hovind-Hougen, 1979; Levett y col., 2005). Existen dos sistemas de clasificación del género *Leptospira*, basados en características fenotípicas o genotípicas.

El sistema de clasificación fenotípico divide el género en dos especies. Las formas patógenas se incluyen en la especie *Leptospira interrogans* sensu lato, mientras que las formas no patógenas se incluyen en la especie *Leptospira biflexa* sensu lato (Levett, 2001, 2015; Bharti y col., 2003). La unidad taxonómica de este sistema es el serovar, definido en base a características antigénicas detectadas mediante tests de absorción y aglutinación cruzada (CAAT) y caracterizado por cepas de referencia (Levett, 2001, 2015; Bharti y col., 2003). Los serovares con características antigénicas similares se organizan en serogrupos, categoría sin valor taxonómico, pero que aporta información epidemiológica de gran utilidad en el diagnóstico (Levett, 2001; Bharti y col., 2003; Ko y col., 2009). Las leptospiras no patógenas se dividen en 60 serovares y 4 serogrupos, mientras que las patógenas se dividen en más de 250 serovares y 24 serogrupos (Levett, 2001, 2015).

En el sistema de clasificación genotípico, basado en análisis de secuencias del gen *16S rRNA* (Morey y col., 2006) o del genoma completo (Xu y col., 2016; Thibeaux y col., 2018), todos los serovares están representados en un conjunto de genomoespecies (Fig. 2). En este sistema, el género *Leptospira* se divide en tres grupos monofiléticos: saprófitas, intermedias y patógenas (Levett, 2015; Thibeaux y col., 2018). En un estudio publicado recientemente, se identificaron dos subgrupos de leptospiras patógenas, en base a la estructura del genoma accesorio y la virulencia (Thibeaux y col., 2018). Hasta el momento, se identificaron 35 genomoespecies, de las cuales 13 se añadieron este último año (Tabla S1). Además, existen numerosas genomoespecies en proceso de clasificación (Ganoza y col., 2006; Gomard y col., 2016; Scialfa y col., 2017; Dietrich y col., 2018).

Ambas clasificaciones son incompatibles e independientes, ya que las especies genotípicas no se corresponden con las especies fenotípicas. Además, dentro de una misma genomoespecie puede haber serovares patógenos y no patógenos (Fig. 2 y Tabla S2), o el mismo serovar puede estar presente en distintas genomoespecies (Bharti y col., 2003; Victoria y col., 2008; Ko y col., 2009; Zakeri y col., 2010; Levett, 2015; Chiani y col., 2016). La completa caracterización de un aislamiento de *Leptospira* implica entonces, la identificación a nivel de genomoespecie y serovar (Levett, 2015).

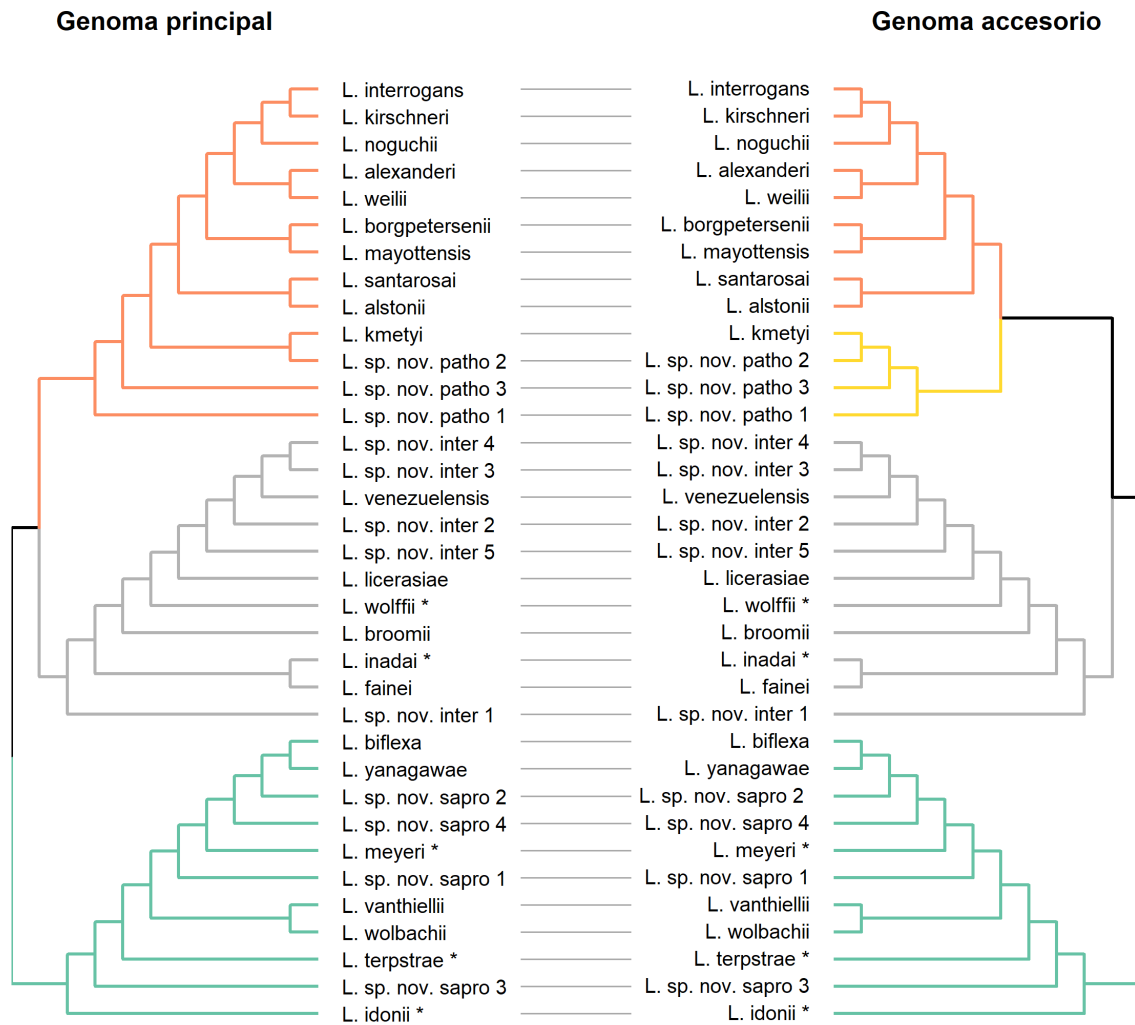


Figura 2. Clasificación de genomoespecies de *Leptospira*. A la izquierda, filogenia basada en la estructura del genoma principal: genomoespecies patógenas (naranja), intermedias (gris) y saprófitas (verde). A la derecha se muestra la filogenia basada en la estructura del genoma accesorio: genomoespecies patógenas de alta virulencia (naranja), patógenas de baja virulencia (amarillo), intermedias (gris) y saprófitas (verde). * Especies con serovares patógenos y no patógenos. Fuente: Dendrogramas elaborados en software R, a partir de los datos publicados en Levett (2015) y Thibeaux y col. (2018)

CICLO DE VIDA Y PERSISTENCIA EN EL AMBIENTE

El ciclo de vida de las leptospiras patógenas involucra excreción por la orina del hospedador, persistencia en el ambiente, adquisición de un nuevo hospedador (Fig. 3) y colonización de los túbulos renales del mismo a través de la sangre (Ko y col., 2009; Adler y de la Peña Moctezuma, 2010; Haake y Levett, 2015). Las vías de ingreso más comunes son cortes y abrasiones en la piel y mucosas. La transmisión puede darse por contacto directo con orina, fluidos corporales o tejidos de animales infectados, o a través de agua y

suelo contaminados con esta orina (Levett, 2001; Vijayachari y col., 2008; Ko y col., 2009; Haake y Levett, 2015).

Las leptospiras patógenas son incapaces de reproducirse fuera del hospedador, pero pueden persistir durante semanas o meses en el ambiente mediante la formación de biofilms (Trueba y col., 2004; Ristow y col., 2008; Barragan y col., 2011; Wynwood y col., 2014; Vinod Kumar y col., 2015). La probabilidad de encontrar leptospiras patógenas en el ambiente depende, entre otros factores, de la geografía, el clima, la presencia de animales en las inmediaciones, las condiciones sanitarias, la fuente y el movimiento del agua (Bharti y col., 2003; Ismail y col., 2014; Rawlins y col., 2014; Lall y col., 2016; Mason y col., 2016; Barragan y col., 2017a). En los sistemas urbanos, el agua de lluvia o inundación puede hacer colapsar los sistemas cloacales, filtrando agua contaminada hacia los suelos y creando un ambiente propicio para la persistencia de leptospiras patógenas (Lall y col., 2016; Barragan y col., 2017a). Además, se ha observado que un pH levemente alcalino, temperaturas cálidas, alta viscosidad y/o turbidez del medio, aumentan el tiempo de persistencia en el ambiente (Gordon Smith y Turner, 1961; Khairani-Bejo y col., 2004; Trueba y col., 2004; Viau y Boehm, 2011; Chadsuthi y col., 2012; Wynwood y col., 2014).

HOSPEDADORES

En los hospedadores permanentes o reservorios, la infección suele ser leve o asintomática (Ko y col., 2009; Ellis, 2015). Las leptospiras se alojan de forma crónica en los túbulos renales y el tracto genital mediante la formación de biofilms (Ristow y col., 2008; Ko y col., 2009; Brihuega y col., 2012; Gomes y col., 2018; Yamaguchi y col., 2018), excretándose periódicamente con la orina y fluidos corporales (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010; Ellis, 2015). El contagio puede ocurrir por transmisión horizontal o vertical (WHO, 2003; Villanueva y col., 2014; Ellis, 2015). Si bien se considera a las ratas (*Rattus* spp.) como principal reservorio, los perros, cerdos, ovejas y vacas también son capaces de desarrollar infecciones asintomáticas y eliminar leptospiras por la orina (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010; Ellis, 2015). Algunos autores sugieren que el ganado podría tener tanta o más importancia que los roedores en la transmisión de la enfermedad (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010; Barragan y col., 2017a). Además, estudios recientes han detectado leptospiras patógenas en tejido renal y orina de gatos (Chan y col., 2014; Rodriguez y col., 2014; Trochmann Cordeiro y col., 2017; Weis y col., 2017) y murciélagos (Gomard y col., 2016; Mayer y col., 2017; Ballados-González y col., 2018; Dietrich y col., 2018), lo cual indicaría que se trata de especies reservorio.

Los hospedadores incidentales, suelen presentar cuadros agudos de leptospirosis y dispersión limitada de leptospiras patógenas a través de la orina (WHO, 2003; Ko y col.,



Figura 3. Ciclo de transmisión de la leptospirosis. El ser humano puede adquirir la infección por contacto directo con orina y tejidos de mamíferos domésticos (perros, cerdos, vacas, etc), sinantrópicos (*Rattus* sp., *Mus musculus*) o silvestres (zorros, comadrejas, carpinchos, roedores silvestres, etc) infectados. La transmisión también puede ocurrir en forma indirecta a través del ambiente contaminado con orina de animales infectados. Fuente Imágenes: Lic. Tamara Ricardo, Lic. Leonardo Leiva y [Pixabay](#).

2009; Ellis, 2015). Las formas de contagio más comunes son a través de abrasiones en la piel y mucosas e inmersión prolongada en aguas contaminadas. Menos frecuentemente, por mordeduras, ingestión o inhalación de agua contaminada o por contacto sexual (Ko y col., 2009; Ellis, 2015; Haake y Levett, 2015). El ser humano es un hospedador incidental de leptospirosis. La probabilidad de infección se ha visto asociada a la ocupación (caza, pesca, ganadería, agricultura, minería, veterinaria, etc), práctica de actividades deportivas o recreativas al aire libre y exposiciones involuntarias relacionadas al área de residencia (Levett, 2001; Ko y col., 2009; Haake y Levett, 2015).

Si bien todas las leptospiras patógenas tienen capacidad para infectar a cualquier animal, cada serovar suele ser endémico de una región y limitarse a ciertas especies reservorio (Acha y Szyfres, 2001; Ko y col., 2009; Adler y de la Peña Moctezuma, 2010; Ellis, 2015). Una misma especie, puede ser reservorio de determinado serovar y hospedador incidental de otros (Levett, 2001; WHO, 2003; Romero-Vivas y col., 2012; Ellis, 2015). Los perros son reservorio del serogrupo Canicola, con diversas manifestaciones clínicas, los casos más graves suelen estar asociados a infecciones incidentales con los los serogrupos Pomona, Icterohaemorrhagie, Copenhageni y Pyrogenes (Acha y Szyfres, 2001; Suepaul y col., 2010; Grune Loffler y col., 2014a; Ellis, 2015; Lelu y col., 2015). Vacas y ovejas son reservorio del serogrupo Hardjo, causante de abortos y trastornos reproductivos, las formas agudas generalmente se producen por infección incidental con serogrupos Pomona, Icterohaemorrhagie y Gryppotyphosa (Acha y Szyfres, 2001; Ellis, 2015; Fang y col., 2015; Kirkimbayeva y col., 2015; Salgado y col., 2015). Los cerdos son reservorio de los serogrupos Pomona, Australis y Tarassovi, presentando diversos trastornos reproductivos. Además pueden sufrir infecciones incidentales con los serogrupos Grippotyphosa, Icterohaemorrhagie y Canicola (Acha y Szyfres, 2001; Ellis, 2015). Los roedores sinantrópicos (*Rattus* spp y *Mus musculus*) son reservorio de los serogrupos Icterohaemorrhagie y Ballum y pueden ser hospedadores incidentales de otros serogrupos (Acha y Szyfres, 2001; Suepaul y col., 2010; Perez y col., 2011; Dos Santos Paixão y col., 2014; Grune Loffler y col., 2014b; Ellis, 2015; Fratini y col., 2015).

Se han encontrado leptospiras patógenas en casi todas las especies de mamíferos, incluyendo armadillos (Kin y col., 2015), ballenas (Grune Loffler y col., 2015), jabalíes (Vengust y col., 2008; Vieira y col., 2016), lobos marinos (Lloyd-Smith y col., 2007; Cameron y col., 2008; Wu y col., 2014), ocelotes (de Lima Brasil y col., 2013), zorros (Scialfa y col., 2013; Vieira y col., 2016), carpinchos (Langoni y col., 2016; Moreno y col., 2016), coipos (Vein y col., 2014; Fratini y col., 2015) y otros roedores silvestres (Dirsmith y col., 2013; Gozzi y col., 2013; Gomes y col., 2017; Lovera y col., 2017; Colombo y col., 2018). Además, se encontraron leptospiras patógenas en aves (Jobbins y Alexander, 2015), insectos (Gonzalez-Astudillo y col., 2016), peces (Mgode y col., 2014) y reptiles (Lindtner-

Knific y col., 2013; Jobbins y Alexander, 2015; Dezzutto y col., 2017; Perez-Flores y col., 2017). Se desconoce aún si estos animales actúan como reservorio, dispersando leptospiras patógenas al ambiente, o si se trata de infecciones incidentales.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y DIAGNÓSTICO

La leptospirosis es una enfermedad bifásica. En la fase aguda o leptospiremia las leptospiras que ingresan al organismo se diseminan hacia el torrente sanguíneo. La segunda fase, leptospiruria, ocurre entre 5 y 14 días después de la exposición cuando el hospedador monta una respuesta inmune e involucra la excreción de leptospiras por la orina (Acha y Szyfres, 2001; Levett, 2001; Bharti y col., 2003; Ko y col., 2009; Haake y Levett, 2015). Se cree que el pH bajo de la orina humana limita el tiempo de supervivencia de las leptospiras (Haake y Levett, 2015). La transmisión persona a persona es muy poco frecuente (Levett, 2001; Haake y Levett, 2015).

El espectro clínico de la leptospirosis es muy amplio, siendo comunes los síndromes febriles inespecíficos (fiebre alta, cefaleas y mialgias). Estos pueden confundirse con los síntomas causados por influenza, dengue u otras infecciones endémicas de la región. También existen formas severas, como los síndromes de Weil y de hemorragia pulmonar (Levett, 2001; Bharti y col., 2003; Vijayachari y col., 2008; Ko y col., 2009; Haake y Levett, 2015). La gravedad de la enfermedad suele estar asociada, entre otros factores, a la susceptibilidad del hospedador, la cantidad de leptospiras que ingresaron al organismo y la virulencia de la cepa infectante (Ko y col., 2009; Haake y Levett, 2015; Barragan y col., 2017b). Los casos graves de leptospirosis se caracterizan por daño vascular y hemorragias, suelen verse afectados hígado, pulmones, riñones y meninges (Bharti y col., 2003; Vijayachari y col., 2008; Ko y col., 2009; Haake y Levett, 2015).

La leptospirosis humana y animal, puede diagnosticarse por detección directa de la bacteria en tejidos, o por detección de anticuerpos específicos (Bharti y col., 2003; Haake y Levett, 2015). Las técnicas directas incluyen el cultivo, las PCR convencionales y real-time y la tinción inmunohistoquímica (Bharti y col., 2003; WHO, 2003; Haake y Levett, 2015). El cultivo se suele realizar en medio EMJH (Ellinghausen, McCullough, Johnson y Harris), las leptospiras tienen un crecimiento lento, debiendo monitorearlo por aproximadamente 4 meses, y es una técnica poco sensible que se contamina con facilidad (Bharti y col., 2003; WHO, 2003; Haake y Levett, 2015). Las técnicas de PCR utilizan genes housekeeping (*rrs*, *gyrB*, *secY*) o asociados a la patogenicidad (*LipL32*, *lig*, *lfb1*). Tienen alta sensibilidad y permiten la cuantificación, pero no detectan el serovar infectante y requieren equipos y reactivos costosos (Bharti y col., 2003; WHO, 2003; Haake y Levett, 2015). Dentro de las técnicas serológicas, se considera al test de microaglutinación (MAT)

como estándar de referencia por su alta sensibilidad y especificidad. El MAT, tiene la desventaja de que solamente se realiza en algunos laboratorios de referencia y requiere de muestras tomadas en ambas fases de la enfermedad. La interpretación de los resultados puede ser subjetiva y presentar variaciones geográficas (Bharti y col., 2003; WHO, 2003; Vijayachari y col., 2008; Haake y Levett, 2015). Algunas técnicas serológicas, como el antígeno termorresistente (TR) y el enzimoimmunoensayo (ELISA), se utilizan a modo de screening ante casos sospechosos de leptospirosis y permiten detectar anticuerpos durante la primer fase de la enfermedad. Estas técnicas son rápidas de realizar y de bajo costo, su desventaja es que no son confirmatorias y deben complementarse con MAT, PCR e información epidemiológica (WHO, 2003; Vijayachari y col., 2008; Haake y Levett, 2015). Actualmente se está evaluando en humanos y distintos grupos de animales, la efectividad de la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), como una alternativa rápida y relativamente económica de diagnóstico y vigilancia epidemiológica de leptospirosis (Sonthayanon y col., 2011; Grune Loffler y col., 2016; Suwancharoen y col., 2016; Sengupta y col., 2017; Wong y col., 2017).

SITUACIÓN DE LEPTOSPIROSIS EN ARGENTINA Y EL MUNDO

Anualmente, se reportan a nivel mundial entre 500 000 y 1.03 millones de casos graves de leptospirosis, con una mortalidad superior al 10 % (Costa y col., 2015a; Torgerson y col., 2015; Schneider y col., 2017). Se considera que la carga mundial de leptospirosis está subestimada debido a dificultades en el diagnóstico, falta de infraestructura de laboratorio, o a que en algunos países no se cuenta con un sistema de notificación de casos (Costa y col., 2012; Costa y col., 2015a; Haake y Levett, 2015; Torgerson y col., 2015). Además, los casos que llegan a confirmarse y reportarse al sistema de vigilancia suelen ser formas graves, que representan un pequeño porcentaje del total de infecciones (Costa y col., 2015a; Torgerson y col., 2015; Schneider y col., 2017). El grupo demográfico más afectado por la leptospirosis son los hombres de entre 20-49 años, quienes suelen estar expuestos a factores de riesgo en el ámbito laboral y/o recreativo (Costa y col., 2015a; Haake y Levett, 2015; Torgerson y col., 2015).

Latinoamérica representa un 10 % de los casos mundiales de leptospirosis, con mayor incidencia en áreas tropicales y subtropicales (Costa y col., 2012; Costa y col., 2015a; Schneider y col., 2017). En la región, los principales factores de riesgo son la ocupación rural y el contacto con ambientes inundados, que suelen estar asociados a la pobreza y a deficiencias en infraestructura sanitaria (CCLA - AAVLD, 2002; Costa y col., 2015a; Schneider y col., 2017). La mayor parte de los casos se concentra en Brasil, seguido por

Perú, Colombia y Ecuador (Schneider y col., 2017).

Argentina fue uno de los países latinoamericanos con mayor alerta de casos sospechosos para el período 2010-2014 (Schneider y col., 2017). El primer caso de leptospirosis en Argentina se reportó en la provincia de Santa Fe en 1915 (Cacchione y col., 1975), siendo obligatoria la notificación de casos desde 1960 (Ley Nacional 15 465-1960). Actualmente, la leptospirosis se considera un problema de salud pública en todo el territorio nacional, debido a los daños que ocasiona en la salud humana, animal y en las actividades económicas (CCLA - AAVLD, 2002; MSAL, 2014). Entre 2005-2017, se reportaron 14 319 casos sospechosos de leptospirosis (MSAL, 2012b, 2013, 2015, 2016a, 2017, 2018). En el período 2011-2017 se confirmaron 917 casos de leptospirosis en Argentina, sobre una población estimada de 40 117 096 habitantes según el censo 2010 (INDEC, 2010). Si bien se reportaron casos sospechosos en todo el país, no se confirmó ninguno en las provincias de La Rioja, Mendoza, San Juan, Santa Cruz y Tierra del Fuego. La mayoría de los casos confirmados provienen de las provincias de Santa Fe, Buenos Aires y Entre Ríos (Fig. 4). Las mismas, se consideran endémicas para leptospirosis y presentan brotes epidémicos durante inundaciones (Vanasco y col., 2000; Vanasco y col., 2002; Vanasco y col., 2008; CCLA - AAVLD, 2002; Martín y col., 2002; Musacchio y col., 2010; MSAL, 2012b, 2014).

En los últimos años, se ha observado un aumento en el número de casos de leptospirosis severos con síndrome hemorragia pulmonar, el cual presenta una mortalidad superior al 50 % (CCLA - AAVLD, 2002; Seijo y col., 2002; Cudós y col., 2014; Chiani y col., 2016). Estudios realizados en la provincia de Santa Fe, sugieren que algunos casos de hemorragia pulmonar en la región son causados por leptospiras del serogrupo Canicola (Rubel y col., 1997; Cudós y col., 2014; Chiani y col., 2016). Considerando que la leptospirosis se transmite en la interfaz humano-animal-ambiente, provocando daños sanitarios y económicos, resulta apropiado abordar su estudio desde un enfoque “Una Salud” (Schneider y col., 2012; Petrakovsky y col., 2014; Schneider y col., 2017). Este enfoque propone integrar los aspectos de salud humana, animal y ambiental desde una perspectiva interdisciplinaria para lograr un mayor conocimiento y control de la enfermedad (Frank, 2008). Por lo expuesto anteriormente, se utilizará el enfoque “Una Salud” para profundizar el conocimiento de la eco-epidemiología de leptospirosis en asentamientos marginales ribereños de Santa Fe.

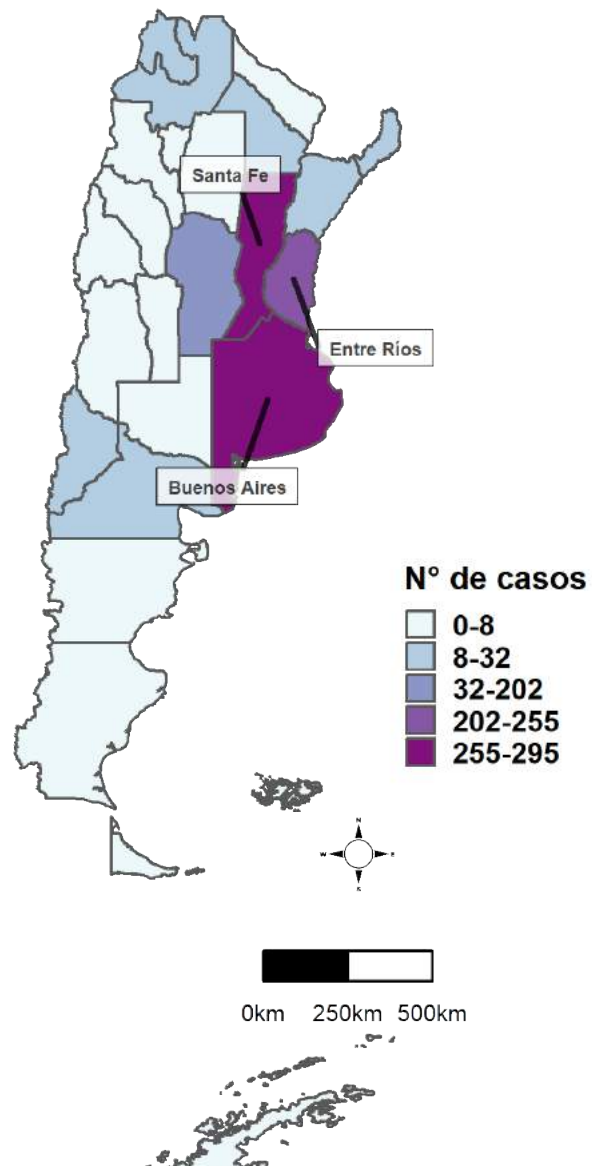


Figura 4. Distribución de casos de leptospirosis por provincia, Argentina (2011-2017). Fuente: elaboración propia a partir de los datos publicados en MSAL ([2012a](#), [2013](#), [2015](#), [2016a](#), [2017](#), [2018](#)), e INDEC: Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2010 y geografía y códigos geográficos del Sistema Estadístico Nacional [Consulta: 28/09/2018].

OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo fueron lograr un mayor conocimiento de los factores que pueden jugar un rol en la circulación de leptospiras patógenas en sectores antropizados de la llanura de inundación del Paraná Medio.

Como objetivos específicos se planteo:

- Describir la distribución espacial y temporal de los casos de leptospirosis humana reportados para Santa Fe.
- Evaluar los conocimientos, actitudes y prácticas (CAPs) relacionadas al riesgo de leptospirosis en los pobladores de asentamientos marginales ribereños.
- Evaluar cuáles especies de micromamíferos de la zona actúan como hospederos de leptospiras patógenas y la influencia del grado de perturbación antrópica sobre las poblaciones de especies hospederas y la presencia de leptospiras patógenas en los cuerpos de agua.

CAPÍTULO 1

VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LEPTOSPIROSIS EN LA PROVINCIA DE SANTA FE

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial causada por espiroquetas del género *Leptospira*. Las leptospiras patógenas se excretan con la orina de mamíferos domésticos y silvestres infectados, pudiendo persistir durante semanas o meses en el ambiente (WHO, 2003; Trueba y col., 2004; Haake y Levett, 2015). La infección en humanos es incidental y puede darse por contacto directo con orina y/o tejidos de animales infectados, o indirectamente a través del ambiente contaminado (WHO, 2003; Ko y col., 2009; Haake y Levett, 2015).

Anualmente se reportan en el mundo entre 500 000 y 1.03 millones de casos graves de leptospirosis, con una mortalidad superior al 10 % (Costa y col., 2015a; Haake y Levett, 2015; Schneider y col., 2017). Latinoamérica es una de las regiones que concentra mayor cantidad de casos, siendo los principales factores de exposición el contacto con ambientes inundados y la ocupación rural, vinculados a su vez a la pobreza y a deficiencias en el acceso a servicios sanitarios (MSAL, 2014; Costa y col., 2015a; Schneider y col., 2017). El clima influye sobre la incidencia de leptospirosis, mostrando una marcada estacionalidad coincidente con la estación lluviosa (Lau y col., 2010; Chadsuthi y col., 2012; Weinberger y col., 2014).

Entre 2005 y 2017 se reportaron 14 319 casos sospechosos de leptospirosis en Argentina (MSAL, 2012b, 2013, 2015, 2016a, 2017, 2018), siendo uno de los países latinoamericanos con mayor alerta de casos (Schneider y col., 2017). El primer caso de leptospirosis en Argentina se reportó en 1915 en la provincia de Santa Fe (Cacchione y col., 1975) y a partir de 1960 se incluye entre las enfermedades de notificación obligatoria (Ley Nacional N° 15 465/1960). En la actualidad, la leptospirosis se considera un problema emergente de salud pública a nivel nacional (CCLA - AAVLD, 2002; MSAL, 2007, 2014). Si bien se han reportado casos en todo el país, la leptospirosis es endémica en las provincias de Santa Fe, Entre Ríos y Buenos Aires (CCLA - AAVLD, 2002; MSAL, 2012a, 2014). En estas provincias, suelen observarse brotes epidémicos durante períodos de lluvias intensas e inundaciones (Vanasco y col., 2000; Vanasco y col., 2002; Vanasco y col., 2008; CCLA - AAVLD, 2002; Musacchio y col., 2010; MSAL, 2012b; Cudós y col., 2013). Sin embargo, existen escasos estudios que investiguen los factores de riesgo de leptospirosis en la región (CCLA - AAVLD, 2002; Martín y col., 2002; Vanasco y col., 2008). Los objetivos de este trabajo fueron describir la variación espacial y temporal de los casos de leptospirosis en la provincia de Santa Fe e investigar factores de riesgo asociados a la infección.

MATERIALES Y MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDIO

La provincia de Santa Fe se sitúa en la región centro-este de Argentina. La mayor parte del territorio es una llanura con inclinación noroeste-sudeste y forma parte de las ecorregiones del Chaco Húmedo y Seco, Delta e Islas del Paraná, Espinal y Pampeana (Fig. 1.1). La temperatura media anual es de entre 20-22°C en el norte de la provincia y de entre 16-18°C en el sur, con una precipitación anual de entre 1200-1400 mm en el este de la provincia, disminuyendo a 800-1000 mm hacia el oeste (Servicio Meteorológico Nacional, 2018). Los principales ríos son el Paraná, que marca el límite este de la provincia y la recorre de norte a sur y los ríos Salado y Carcarañá, que atraviesan la provincia de oeste a este (Fig. 1.1). Las tierras más bajas tienden a inundarse periódicamente por crecidas de los ríos Paraná y Salado. La provincia se divide en 19 departamentos y tiene una población de 3 194 537 habitantes según el Censo 2010 (INDEC, 2010).

DEFINICIÓN DE CASOS

Se consideran casos sospechosos de leptospirosis, aquellos con síndrome febril agudo y antecedentes epidemiológicos compatibles en los 30 días previos al inicio de los síntomas (MSAL, 2014). Entre estos antecedentes se incluyen la realización de actividades que impliquen contacto con agua estancada o animales reservorio, y haber estado en contacto con ambientes inundados (MSAL, 2014). Se consideran casos probables de leptospirosis aquellos casos sospechosos: (a) reactivos para las pruebas de screening ELISA o antígeno TR, (b) reactivos para el test de Microaglutinación (MAT) con título $<1:200$ en muestra única (MSAL, 2014). Se consideran casos confirmados de leptospirosis, aquellos casos sospechosos o probables con resultados de laboratorio compatibles, o con exposición a la misma fuente durante el mismo período que un caso confirmado por laboratorio (MSAL, 2014). Los resultados de laboratorio compatibles incluyen: (a) detección por cultivo bacteriano o PCR, (b) reactivo a MAT con título $\geq 1:200$ en muestra única, (c) seroconversión a MAT en 2 o más muestras con más de 10 días de evolución (Vanasco y col., 2008; MSAL, 2014). Se consideran casos descartados de leptospirosis los casos sospechosos: (a) no reactivos a MAT en 2 o más muestras con más de 7 días de separación, (b) no reactivos a ELISA o MAT en muestras con más de 10 días de evolución, (c) con diagnóstico confirmado de otra enfermedad febril (MSAL, 2014).

FUENTES DE DATOS

Se obtuvieron registros anónimos a partir de la base de datos del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica por Laboratorios de Argentina (SIVILA). Cada registro in-

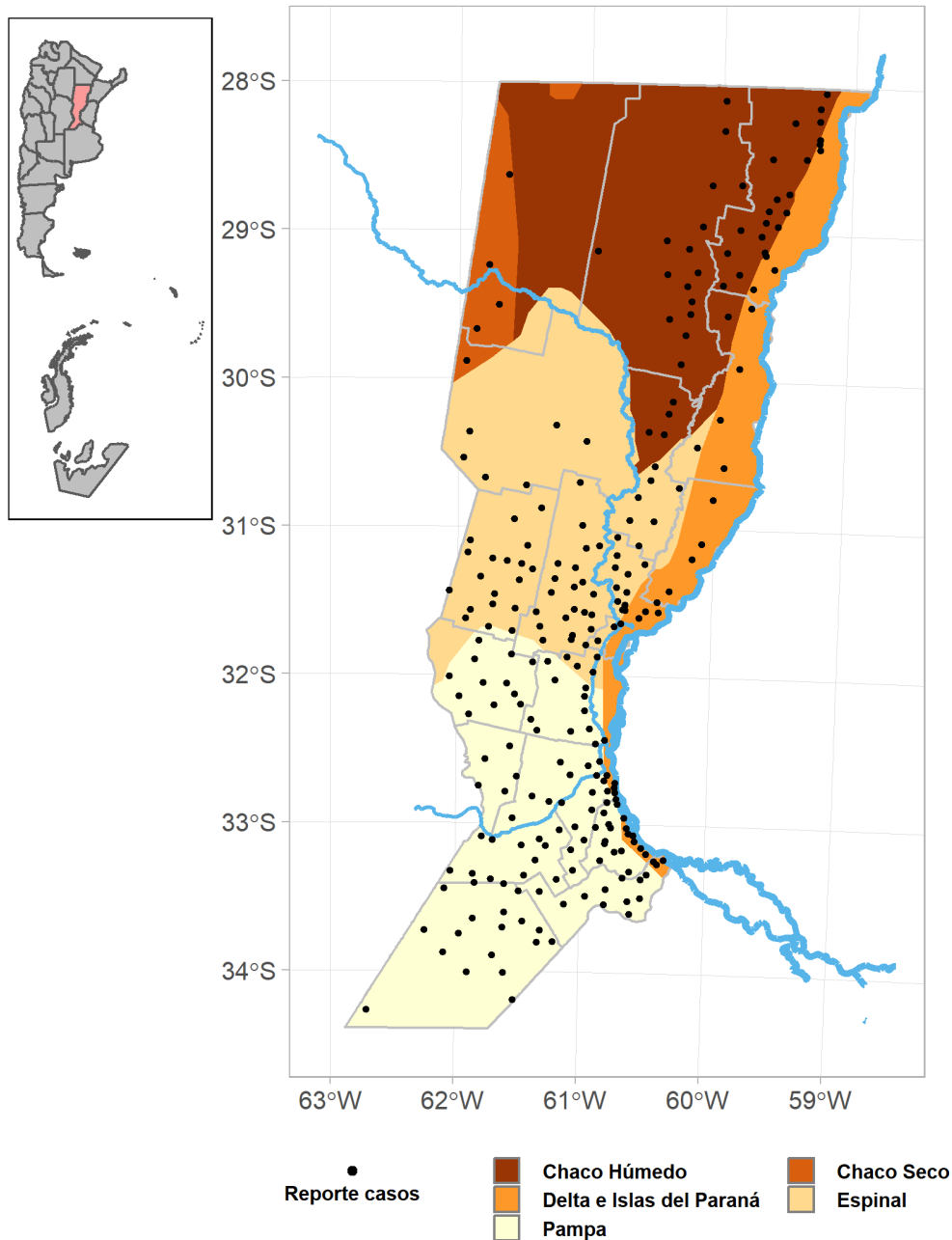


Figura 1.1. Área de estudio. Provincia de Santa Fe: departamentos, ecorregiones y principales ríos. Los puntos indican localidades donde se reportaron casos sospechosos de leptospirosis en el período 2010-2017. Fuente: elaboración propia utilizando software R (R Development Core Team, 2017), en base a capas vectoriales del [Instituto Geográfico Nacional](#) y [Administración de Parques Nacionales](#).

cluyó información sobre sexo, edad, grupo etario, departamento y localidad de residencia. Como fecha de cada registro se utilizó el mes de inicio de los síntomas, cuando esta información no estaba completa se utilizó el mes de la fecha de toma de la primer muestra de suero. Se consideraron como casos de leptospirosis aquellos con diagnóstico confirmado.

Se obtuvieron datos históricos de temperatura (°C), precipitación (mm) y altura de los ríos Paraná y Salado (m) a partir de 13 estaciones meteorológicas y 14 estaciones hidrológicas. A fin de representar la dinámica hidrológica y el clima en toda la provincia, se promediaron los valores de cada variable entre las distintas estaciones de medición. Los datos fueron proporcionados por el [Servicio Meteorológico Nacional](#), el [Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria \(INTA\)](#), el [Centro de Información Meteorológica \(CIM\) de la Universidad Nacional del Litoral](#) y el [Gobierno de la Provincia de Santa Fe](#). El período de estudio fue entre 2010-2017 para los casos de leptospirosis y entre octubre de 2009 y diciembre de 2017 para variables climáticas.

Se obtuvieron datos de población por departamento a partir de capas vectoriales proporcionadas por el [Instituto Nacional de Estadísticas y Censos](#). Estas capas, además se utilizaron para crear centroides espaciales con las coordenadas geográficas y una matriz de adyacencia con los vecinos de cada departamento. Todos los datos se filtraron y analizaron en software R (R Development Core Team, 2017).

ANÁLISIS DE DATOS

Se describieron frecuencias (%) de casos por sexo y grupo etario. Con el fin de detectar patrones temporales, se descompuso la serie de tiempo de casos mensuales de leptospirosis según método STL (Cleveland y col., 1990) con el paquete *forecast* (Hyndman y Khandakar, 2008). Se evaluaron asociaciones entre casos mensuales de leptospirosis y variables climáticas mediante GLM con estructura de error binomial negativa. Esta distribución, permite controlar sobredispersión de los datos (Agresti, 2015). Considerando que el efecto del clima sobre la enfermedad no es inmediato, se creó un set de variables con desfases (*lag*) de entre 1 y 3 meses. Estas variables incluyeron: altura mensual promedio (m) de los ríos Paraná y Salado, temperatura mensual máxima, media y mínima promedio (°C) y precipitación mensual (mm). Se consideró además la precipitación acumulada durante los 3 meses previos. Para controlar variabilidad debida a estacionalidad, los modelos incluyeron un término de Fourier, consistente en pares de funciones seno-coseno que reflejan el ciclo estacional de 12 meses (Bhaskaran y col., 2013; Hyndman y Athanasopoulos, 2018). Se utilizó criterio de información de Akaike (AIC) para seleccionar las variables que mejor expliquen los casos mensuales de leptospirosis. Como suele existir colinearidad entre variables climáticas, se analizó correlación parcial entre los pares de variables y el término de Fourier. Aquellas variables con $r_{\text{Pearson}} < 0.8$ se incluyeron en un modelo multivariado, a partir del cual se seleccionó el modelo más parsimonioso por un proceso manual de step-backward. A fin de trabajar con escalas comparables, las variables numéricas se centraron y estandarizaron. Los resultados del modelo final se reportaron como razón de tasas (IRR) y su intervalo de confianza al 95 % (95 % CI).

Se calculó tasa de incidencia (casos cada 100 000 habitantes) por departamento, a partir de un modelo generalizado mixto con estructura de error binomial negativa. El modelo incluyó como efecto aleatorio el departamento de residencia, como efecto fijo al intercepto y $\log(\text{población}/10^5)$ como offset. La localidad de residencia no se consideró dentro de los efectos aleatorios por ser un dato faltante en algunos registros. A fin de identificar áreas de riesgo de leptospirosis, se ajustó un modelo cuyo efecto aleatorio considera variación espacial no explicada. Este efecto espacial varía entre departamentos, pero es común a los residentes de un mismo departamento (Hagan y col., 2016). El modelo se ajustó por Integrated Nested Laplace Approximation (INLA), que permite la incorporación de efectos espaciales al enfoque bayesiano (Rue y col., 2009; Bakka y col., 2018). Se excluyeron del análisis aquellos casos sin información respecto al departamento de residencia. Los resultados se expresaron como mapas coropléticos, utilizando el paquete *sf* (Pebesma, 2018). Para el ajuste de modelos frecuentistas, se utilizó el paquete *glmmTMB* (Brooks y col., 2017), mientras el análisis bayesiano se realizó con el paquete *brinla* (Faraway y col., 2018). El nivel de significancia estadística se estableció como $P \leq 0.05$.

RESULTADOS

CASOS DE LEPTOSPIROSIS, FACTORES DEMOGRÁFICOS Y VARIABLES AMBIENTALES

Entre enero de 2010 y diciembre de 2017, se reportaron 7114 casos sospechosos en la provincia de Santa Fe. De los mismos, 4.7% fueron confirmados como casos de leptospirosis, 6% fueron casos probables, se descartó leptospirosis en 24.2% y el 65.1% restante permaneció como caso sospechoso. De 334 casos confirmados de leptospirosis con datos completos, 85.9% fueron hombres y 44% estaba en el grupo etario de los 25-44 años. La edad de contagio tuvo un rango de entre 3 y 84 años, con una mediana de 34 años y no difirió significativamente entre sexos ($P = 0.123$).

Los casos mensuales de leptospirosis presentaron variación en el tiempo, aumentando anualmente entre el verano y principios del otoño (Fig. 1.2). Se observó un brote a principios de 2015, con un máximo de 37 casos durante el mes de marzo (Fig. 1.2). Se observó estacionalidad en los casos mensuales de leptospirosis (Figs. 1.2 y S1). El factor estacional alcanzó un máximo en marzo y un mínimo en septiembre, correspondiendo a los meses en que se observan la mayor y menor cantidad de casos. Descartando el efecto de la estacionalidad y fluctuaciones aleatorias, el componente de ciclo-tendencia muestra oscilaciones en el número de casos de leptospirosis cada dos años, alcanzando un mínimo en 2012 y un máximo en 2015 (Figs. 1.2 y S1).

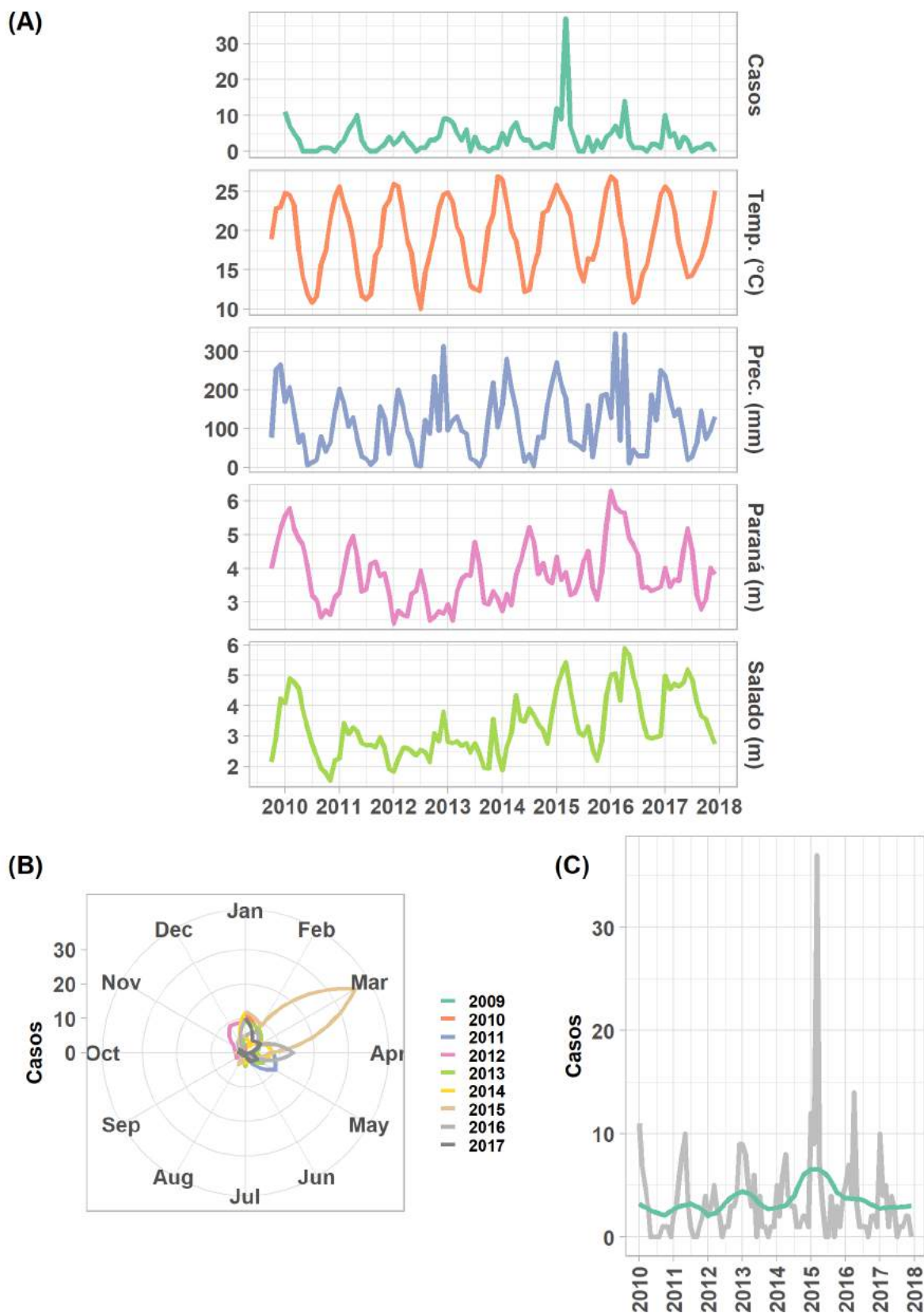


Figura 1.2. Variación temporal de casos de leptospirosis en la provincia de Santa Fe, Argentina (2010-2017). (A) Variación mensual de casos de leptospirosis ($n = 303$) y variables climáticas en la provincia de Santa Fe; (B) Gráfico polar estacional de los casos mensuales de leptospirosis; (C) Casos mensuales de leptospirosis: datos crudos (gris) y componente de ciclo-tendencia (verde).

ASOCIACIÓN ENTRE CASOS DE LEPTOSPIROSIS Y VARIABLES AMBIENTALES

Se encontraron asociaciones significativas entre casos mensuales de leptospirosis con la precipitación, controlando las variaciones estacionales mediante inclusión de términos de Fourier (Tabla 1.1). Las mayores asociaciones correspondieron a la precipitación con desfase de 2 meses y las precipitaciones acumuladas en los tres meses previos (Tabla 1.1). En base al análisis de correlación parcial, se incluyeron ambas variables en el modelo multivariado. En este modelo, el riesgo de leptospirosis aumentó en función de la precipitación desfasada 2 meses (IRR: 1.34, 95 % CI: 1.09 – 1.66) y la precipitación acumulada en los 3 meses previos (IRR: 1.52, 95 % CI: 1.12 – 2.07).

Tabla 1.1. Comparación de modelos univariados para analizar asociación entre variables climáticas y casos mensuales de leptospirosis, controlando por variación estacional (GLM binomial negativo con término de Fourier)

	AIC	dAIC	df	weight
Precipitación mensual, lag 2	397.69	0.00	5	0.54
Precipitación acumulada, 90 días	398.08	0.40	5	0.44
Altura río Salado (promedio), lag 1	408.74	11.06	5	0.00
Precipitación mensual, lag 1	408.87	11.18	5	0.00
Modelo nulo	410.23	12.55	4	0.00
Altura río Salado (promedio), lag 2	410.73	13.05	5	0.00
Altura río Paraná (promedio), lag 2	410.81	13.12	5	0.00
Temperatura media (promedio), lag 3	411.18	13.50	5	0.00
Temperatura máxima (promedio), lag 1	411.20	13.51	5	0.00
Altura río Paraná (promedio), lag 1	411.45	13.76	5	0.00
Temperatura máxima (promedio), lag 2	411.63	13.94	5	0.00
Temperatura mínima (promedio), lag 2	411.65	13.96	5	0.00
Temperatura mínima (promedio), lag 3	411.80	14.11	5	0.00
Temperatura mínima (promedio), lag 1	411.94	14.25	5	0.00
Temperatura media (promedio), lag 2	411.99	14.30	5	0.00
Precipitación mensual, lag 3	412.15	14.46	5	0.00
Altura río Salado (promedio), lag 3	412.22	14.53	5	0.00
Temperatura media (promedio), lag 1	412.22	14.53	5	0.00
Temperatura máxima (promedio), lag 3	412.22	14.53	5	0.00
Altura río Paraná (promedio), lag 3	412.23	14.55	5	0.00

AIC: criterio de información de Akaike;

Δ AIC: diferencia entre el AIC del modelo candidato y el mejor modelo;

K: número de parámetros; Wi: pesos de Akaike

lag 1-3: desfase en meses

DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE CASOS DE LEPTOSPIROSIS

Durante el período estudiado, se registraron casos de leptospirosis en todos los departamentos de la provincia, excepto 9 de Julio. De 333 casos con información completa respecto a departamento de residencia, la mayor cantidad se concentró en La Capital (29.4 %) y Rosario (23.1 %), mientras que los departamentos Belgrano (0.3 %), y San Cristóbal (0.6 %) tuvieron la menor cantidad de casos. Según los resultados del GLMM binomial negativo, las mayores tasas de incidencia correspondieron a los departamentos Garay, San Justo y San Javier (Fig. 1.3). El número esperado de casos, obtenido a partir del modelo anterior, se utilizó como offset para el modelo espacial. De acuerdo a los resultados de este último, la región centro-este de la provincia presenta el mayor riesgo relativo de leptospirosis (Fig. 1.3).

DISCUSIÓN

Se identificaron factores de riesgo de leptospirosis en la provincia de Santa Fe a nivel temporal y espacial. Pudo observarse que la gran mayoría de los casos de leptospirosis correspondieron a hombres adultos, concordando con resultados de otras investigaciones (Ko y col., 1999; Martín y col., 2002; Sarkar y col., 2002; Vanasco y col., 2000; Vanasco y col., 2008; Agampodi y col., 2014; Lau y col., 2016; Hagan y col., 2016; Schneider y col., 2017). Esta diferencia entre sexos podría deberse a la mayor participación de los hombres en actividades laborales y recreativas al aire libre, que a su vez suponen mayor exposición a la bacteria (Bovet y col., 1999; Vanasco y col., 2008; Musacchio y col., 2010; Haake y Levett, 2015; Lau y col., 2016).

Los casos de leptospirosis presentaron una marcada estacionalidad, aumentando anualmente entre el verano y principios del otoño. El incremento de los casos de leptospirosis durante la estación lluviosa se reportó con anterioridad en estudios de Latinoamérica (Ko y col., 1999; Barcellos y Sabroza, 2001; Vanasco y col., 2008; Musacchio y col., 2010; Vega-Corredor y Opadeyi, 2014; Schneider y col., 2018), América del Norte (Ward, 2002), África (Katakweba y col., 2012) y el Sudeste Asiático (Pappachan y col., 2004; LaRocque y col., 2005; Perez y col., 2011; Chadsuthi y col., 2012; Ivanova y col., 2012). La incidencia de leptospirosis estuvo afectada por un aumento en las precipitaciones en los dos meses anteriores y la precipitación acumulada en los tres meses previos, variables que podrían indicar riesgo de inundación (Ward, 2002; Lau y col., 2016). Este desfase en el efecto de las variables explicativas, podría deberse al tiempo de persistencia de las leptospiras patógenas en suelos húmedos, y por el tiempo de incubación de la enfermedad (Ward, 2002; Chadsuthi y col., 2012; Lau y col., 2016). Además, durante períodos de lluvias intensas e inundaciones se favorece el contacto entre humanos y animales reservorio, aumentando el

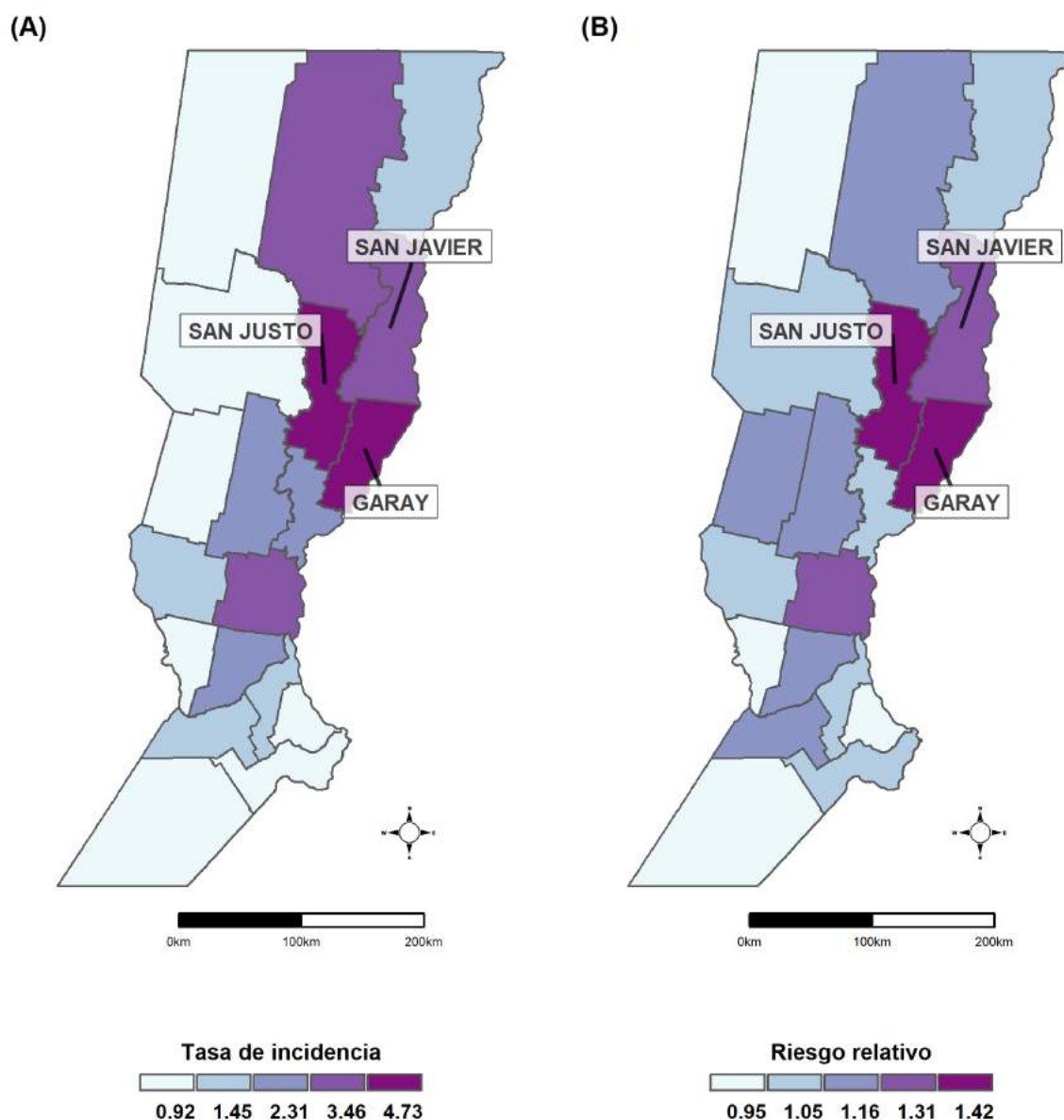


Figura 1.3. Tasa de incidencia y riesgo relativo de leptospirosis por departamento, provincia de Santa Fe, Argentina. (A) Mapa coroplético de la tasa de incidencia promedio por departamento; (B) Mapa coroplético del riesgo relativo por departamento. Fuente: Elaboración propia en base a datos de INDEC. Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2010 y geografía y códigos geográficos del Sistema Estadístico Nacional. [Consulta: 28/09/2018].

riesgo de infección (Lau y col., 2010; Theuerkauf y col., 2013; Weinberger y col., 2014).

A nivel espacial, la distribución de casos de leptospirosis en el período de estudio fue variable entre los distintos departamentos. Otros autores también han detectado variación espacial del riesgo de leptospirosis, asociado a diferencias en características geográficas, ambientales y socio-económicas (Ivanova y col., 2012; Bacallao y col., 2014; Gracie y col., 2014; Vega-Corredor y Opadeyi, 2014; Mwachui y col., 2015; Lau y col., 2016; Hagan y col.,

2016). Los departamentos San Javier, San Justo y Garay presentaron el mayor riesgo relativo de leptospirosis. Los mismos, se hallan en tierras bajas e inundables principalmente dedicadas a la agricultura, ganadería y cultivo de arroz (Fig. S1). Probablemente, este incremento en el riesgo de infección se deba a un mayor contacto con animales y ambientes contaminados, como así también a limitaciones económicas y en el acceso a servicios sanitarios (Muñoz-Zanzi y col., 2014a; Costa y col., 2015a; Della Rossa y col., 2015; Dobbigny y col., 2015; Arbiol y col., 2016; Mwachui y col., 2015). El acceso limitado a los servicios de salud, puede llevar a que la enfermedad progrese hacia formas graves antes de ser diagnosticada, o a que sea confundida con otras enfermedades infecciosas endémicas de la región (Abela-Ridder y col., 2010; Hartskeerl y col., 2011; Torgerson y col., 2015). En este sentido, los casos que se reportan suelen ser aquellos que requieren internación, representando entre 5-15% del total en relación a formas leves o asintomáticas (Hartskeerl y col., 2011; Costa y col., 2015a; Torgerson y col., 2015; Schneider y col., 2017). Por lo tanto, existen esfuerzos concertados a nivel mundial que promueven estrategias para lograr una mejor estimación de la carga de mortalidad y morbilidad asociadas a la leptospirosis (Abela-Ridder y col., 2010).

El presente estudio contó con ciertas limitaciones. Por un lado, las fichas epidemiológicas carecen de información relevante respecto a ocupación, contacto con animales reservorio y aspectos socio-económicos de los pacientes, por lo que no es posible realizar un estudio de casos y controles apareados para evaluar factores de riesgo a nivel individual. Además, gran parte de los registros tienen campos incompletos con respecto a ubicación geográfica, factores de exposición y si la persona vive en una zona urbana o rural. Por otro lado, la gran mayoría de los casos sospechosos reportados quedan sin resolverse, por lo que las medidas de incidencia y riesgo relativo estimadas podrían no reflejar adecuadamente la realidad. Tampoco se dispuso de información sobre el número de muertes ni los serovares infectantes, haciendo imposible estimar la tasa de letalidad de la enfermedad en la región o la incidencia de los distintos serovares.

A pesar de las limitaciones mencionadas, los resultados obtenidos permiten obtener una descripción de la situación epidemiológica de la leptospirosis en la provincia de Santa Fe. Esta información puede ser utilizada para diseñar estudios que permitan investigar en mayor profundidad aspectos de la salud humana, animal y ambiental. Los resultados también resultan relevantes a la hora de desarrollar estrategias de prevención, enfocando las mismas hacia los principales grupos de riesgo, antes de que se produzcan los picos anuales de leptospirosis.

CAPÍTULO 2

CONOCIMIENTOS, ACTITUDES Y PRÁCTICAS (CAP) SOBRE LEPTOSPIROSIS EN RESIDENTES DE ASENTAMIENTOS MARGINALES RIBEREÑOS DE SANTA FE

El contenido de este capítulo fue publicado en:

Ricardo T, Bergero LC, Bulgarella EP y Previtali MA. 2018a. «Knowledge, attitudes and practices (KAP) regarding leptospirosis among residents of riverside settlements of Santa Fe, Argentina». *PLoS Negl Trop Dis* 12 (5): e0006470.

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica causada por espiroquetas del género *Leptospira*. Las leptospiras patógenas se excretan con la orina de mamíferos hospedadores tales como roedores, perros y ganado, pudiendo persistir durante semanas o meses en el ambiente (WHO, 2003; Trueba y col., 2004; Céspedes, 2005; Haake y Levett, 2015). El ser humano es un hospedador incidental, la exposición ocurre por contacto directo con orina y/o tejidos de animales infectados o indirectamente a través de agua y suelo contaminados con esta orina (WHO, 2003; Ko y col., 2009; Haake y Levett, 2015).

En asentamientos marginales urbanos y rurales, la exposición ambiental se incrementa. Entre las principales causas se incluyen deficiencia en el acceso a servicios sanitarios, hacinamiento, viviendas precarias, exposición a la intemperie y vulnerabilidad a inundaciones (Sarkar y col., 2002; Maciel y col., 2008; Reis y col., 2008; Navegantes De Araújo y col., 2013; MSAL, 2014; Lau y col., 2016; Leibler y col., 2016). Los residentes suelen trabajar en la construcción, caza y pesca de subsistencia o preparación de alimentos para la venta dentro del asentamiento (Céspedes, 2005; Maciel y col., 2008; Haake y Levett, 2015; Lau y col., 2016). Otra práctica común es la cría de gallinas, vacas y cerdos en el área peri-domiciliaria, actividades que incrementan el riesgo de contagio (WHO, 2003; Céspedes, 2005; Reis y col., 2008; MSAL, 2014; Lau y col., 2016).

Anualmente, se reportan entre 500 000 y 1.03 millones de casos de leptospirosis en el mundo, con una tasa de mortalidad superior al 10 % (Costa y col., 2015a; Haake y Levett, 2015). Sin embargo, diversos factores indican que la carga mundial de leptospirosis está subestimada. Entre estos se cuenta el amplio espectro clínico de la enfermedad, capaz de imitar síntomas de infecciones endémicas como el dengue y la malaria (Lau y col., 2010; Costa y col., 2015a; Haake y Levett, 2015; Torgerson y col., 2015). Además, la mayoría de los países no cuenta con un sistema de notificación de casos o la notificación de los mismos no es obligatoria (Costa y col., 2012; Haake y Levett, 2015; Schneider y col., 2017).

Latinoamérica es una de las regiones del mundo con mayor cantidad de casos de leptospirosis (Torgerson y col., 2015; Schneider y col., 2017). En 2014 se reportaron 10 088 casos de los cuales un 40.2 % correspondieron a Brasil, seguido por Perú, Colombia y Ecuador (Schneider y col., 2017). Aunque en Argentina solamente se confirmaron 217 casos en el año 2014 (Schneider y col., 2017), entre 2005 y 2017 se reportaron 14 319 casos sospechosos (MSAL, 2012b, 2013, 2015, 2016a, 2017, 2018), siendo uno de los países sudamericanos con mayor alerta de casos (Schneider y col., 2017).

El principal factor de riesgo de leptospirosis en Argentina es el contacto prolongado

con ambientes inundados (Vanasco y col., 2000; Vanasco y col., 2008; CCLA - AAVLD, 2002; MSAL, 2012b, 2014). Las inundaciones pueden llevar a la interrupción de servicios públicos de salud y dañar redes sanitarias, de agua potable y viviendas, desplazando las poblaciones e incrementando el riesgo de exposición a roedores y patógenos (Céspedes, 2005; Lau y col., 2010).

El primer caso de leptospirosis en Argentina se reportó en 1915 en la provincia de Santa Fe (Cacchione y col., 1975). Actualmente se considera a la leptospirosis un problema emergente de salud pública a nivel nacional, siendo obligatoria la notificación de casos (CCLA - AAVLD, 2002; MSAL, 2012a, 2014). La provincia de Santa Fe registra la mayor cantidad de casos anuales (CCLA - AAVLD, 2002; MSAL, 2012a; Cudós y col., 2014), representando 46.4 % de los casos notificados y 38 % de los casos confirmados entre 2012 y 2017 (MSAL, 2013, 2015, 2016a, 2017, 2018). Además, presenta brotes epidémicos durante inundaciones (Vanasco y col., 2000; Vanasco y col., 2002; Vanasco y col., 2008; CCLA - AAVLD, 2002; MSAL, 2012a; Cudós y col., 2013) y en los últimos años se incrementó el número de casos graves asociados a hemorragia pulmonar (CCLA - AAVLD, 2002; Cudós y col., 2014; MSAL, 2014).

La evaluación de conocimientos individuales sobre leptospirosis y del comportamiento sanitario en general, provee información crítica para prevenir la enfermedad (Mohan y Chadee, 2011; Navegantes De Araújo y col., 2013; Samarakoon y Gunawardena, 2013; Sakinah y col., 2015; Arbiol y col., 2016; Lugova y Wallis, 2017). Las encuestas de conocimientos, actitudes y prácticas (CAP), son herramientas de salud pública particularmente útiles para identificar estrategias que permitan cambiar hacia comportamientos más saludables (Mohd Rahim y col., 2012; Essi y Njoya, 2013; Sakinah y col., 2015; Arbiol y col., 2016). A pesar de ello, la leptospirosis es una enfermedad desatendida en Argentina y no existen estudios que evalúen el nivel de conciencia pública sobre la enfermedad. Los objetivos de este estudio fueron describir los conocimientos, actitudes y prácticas sobre leptospirosis, en asentamientos marginales ribereños de Santa Fe afectados por un evento de inundación y evaluar que factores influyen sobre las prácticas preventivas.

MATERIALES Y MÉTODOS

SITIOS DE ESTUDIO

La ciudad de Santa Fe (31°38'0"S, 60°42'0"O), capital de la provincia de Santa Fe, está situada en el noreste de Argentina, en la unión de los ríos Paraná y Salado y cuenta con una población 391 231 habitantes según el Censo 2010 (IPEC - INDEC). Los sitios de estudio comprendieron dos barrios ribereños de Santa Fe y un asentamiento a 30 km NE

de la ciudad. Los tres sitios se sitúan en el valle de inundación del río Paraná, un área altamente vulnerable a inundaciones y con diferentes niveles de deficiencia en infraestructura sanitaria.

Se elaboró un mapa mostrando los cambios en el terreno durante el evento de inundación (Fig. 2.1), utilizando QGIS 3.0 Girona (QGIS Development Team, 2018) con *Semi-automatic Classification Plugin* (Congedo, 2017). El mapa base y las capas raster de los cuerpos de agua se crearon a partir de imágenes satelitales Landsat8 OLI/TIRS obtenidas de U.S. Geological Survey. Las capas vectoriales se descargaron de Natural Earth.

El sitio VP corresponde al barrio de La Vuelta del Paraguayo, situado a orillas del riacho Santa Fe (Fig. 2.1), con alrededor de 408 residentes distribuidos en 64 viviendas (IPEC - INDEC). Este sitio cuenta con servicios de agua de red y electricidad pero no posee cloacas, centros de salud, calles pavimentadas ni transporte público (Rittaca y Vítтори, 2013). El sitio CS corresponde al barrio de Colastiné Sur, situado a orillas del río Colastiné (Fig. 2.1), con alrededor de 1018 residentes distribuidos en 308 viviendas (IPEC - INDEC). Este sitio cuenta con servicios de electricidad, recolección de residuos y transporte público, así como un centro de salud, pero no posee cloacas, agua de red ni calles pavimentadas (Rittaca y Vítтори, 2014). El sitio LZ corresponde a un sector de la localidad de Los Zapallos, situado a orillas del arroyo Leyes a 30 km NE de la ciudad de Santa Fe (Fig. 2.1), con alrededor de 564 residentes distribuidos en 92 viviendas. Este sitio cuenta con servicios de agua de red, electricidad y recolección de residuos, así como un centro de salud en las cercanías (aproximadamente 1.5 km), pero no posee cloacas ni calles pavimentadas (información provista por la Comuna de Santa Rosa de Calchines).

RECOLECCIÓN DE DATOS

Entre marzo y mayo de 2016 se llevó a cabo un estudio transversal para evaluar CAP asociados a leptospirosis. Los datos se tomaron luego de un evento de inundación del río Paraná, que afectó a todos los sitios de estudio (Figs. 2.1 y 2.2). El tamaño muestral se calculó en R software (R Development Core Team, 2017) utilizando el paquete *samplingbook* (Manitz y col., 2017), asumiendo un total de 464 hogares entre las tres comunidades, prevalencia del 50 %, error del 10 % y precisión del 5 %. El tamaño de muestra sugerido fue de 171 hogares. Dado que las poblaciones eran pequeñas y algunos hogares se encontraban inaccesibles por la inundación, se seleccionó a los participantes de la encuesta mediante una técnica de barrido censal, que permitió el muestreo de viviendas evacuadas y no evacuadas. El barrido censal intenta relevar todas las viviendas del área, aunque algunas se hallen inaccesibles o no se haya encontrado ningún residente al momento de la encuesta. Para minimizar la potencial influencia de la presencia de los encuestadores

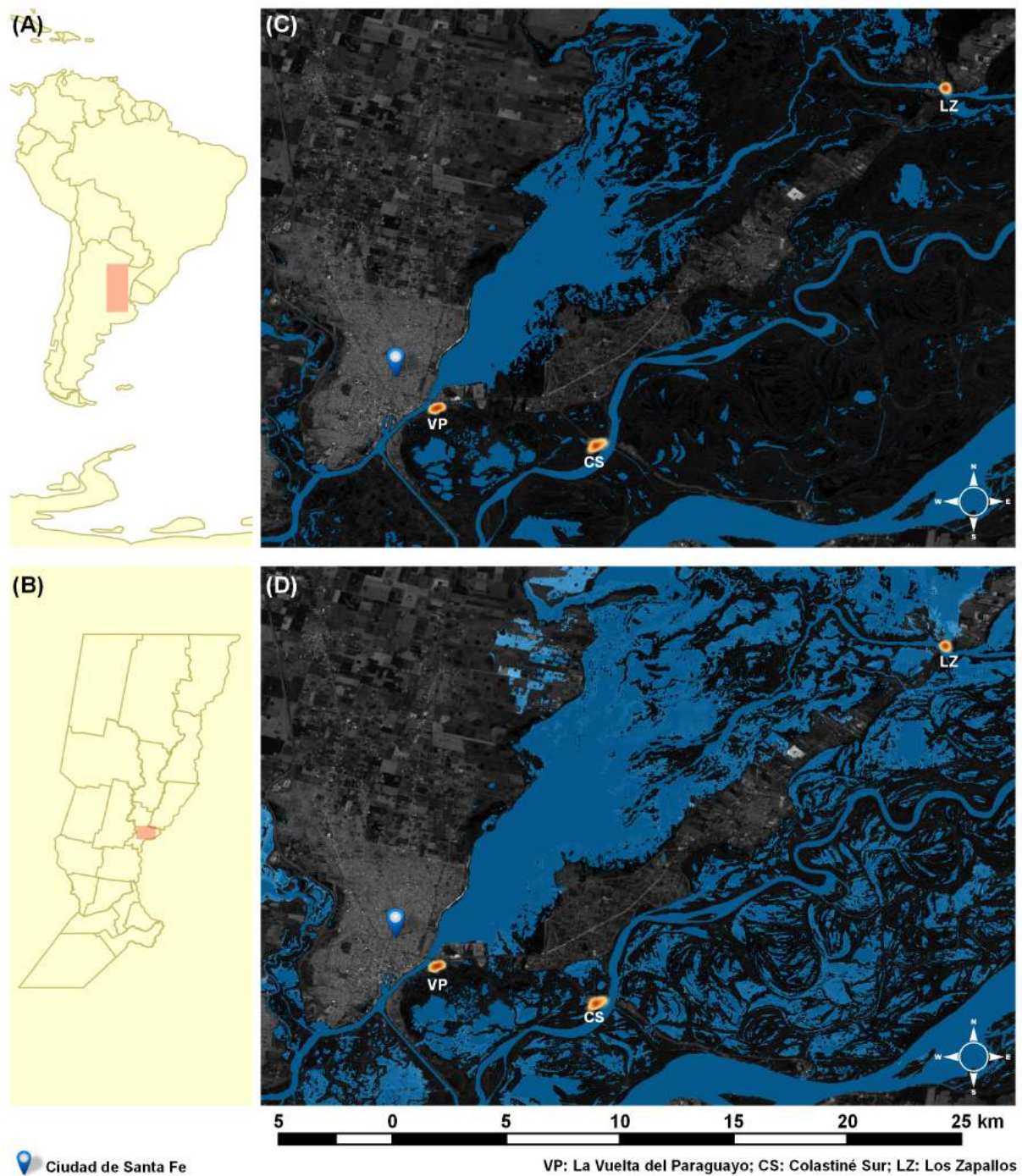


Figura 2.1. Mapa de inundaciones mostrando los sitios de estudio. (A) Ubicación de la provincia de Santa Fe en Argentina; (B) Ubicación del área de estudio dentro de la provincia de Santa Fe; (C) Sitios de estudio antes de la inundación; (D) Sitios de estudio durante la inundación; Las zonas accesibles de los sitios de estudio se muestran como un mapa de calor, con tonos más oscuros indicando mayor concentración de unidades muestrales. Mapa generado en QGIS Geographic Information System. Imágenes satelitales LANDSAT8 OLI/TIRS descargadas de [U.S. Geological Survey](#). Capas vectoriales descargadas de [Natural Earth](#).

sobre las respuestas, se realizó el barrido en una dirección determinada y en la menor cantidad de días posible.

En cada visita a los sitios de estudio, se recopiló la información necesaria por medio de cuestionarios administrados por encuestadores. Se realizó una capacitación para alumnos de grado de la Facultad de Humanidades y Ciencias en la realización de encuestas y en la temática del cuestionario, a cargo de personal del Observatorio Social de la Universidad Nacional del Litoral y de los investigadores del proyecto. En cada hogar visitado, se invitó a responder la encuesta a un residente, intentando obtener representatividad por sexo y grupo etario. De forma similar que en otros estudios de CAP, se incluyó en el cuestionario a residentes mayores de 11 años (Mohan y Chadee, 2011; Navegantes De Araújo y col., 2013; Samarakoon y Gunawardena, 2013; Davlin y col., 2014; Agampodi y col., 2010). Se informó a los residentes sobre los aspectos de la investigación y se obtuvo el consentimiento verbal de aquellos dispuestos a completar el cuestionario. Se respetaron el anonimato de los encuestados y la confidencialidad de los datos obtenidos. El estudio contó con el aval del gobierno de Santa Fe y del Comité de Ética de la Universidad Nacional del Litoral (CAID orientado 2013: “Socioecología de Leptospirosis”).

Antes de la encuesta, se probó el cuestionario en comunidades adyacentes al área de estudio. La versión final consistió en 36 preguntas (Tabla S3), incluyendo factores demográficos como edad, sexo, nivel educativo alcanzado, ocupación y estado de evacuación, así como preguntas para evaluar los CAP sobre leptospirosis del encuestado. Al finalizar la encuesta, se entregó y explicó a cada participante un folleto informativo con los síntomas, formas de transmisión y medidas preventivas más comunes (Fig. S3).

SCORES DE CAP

El cálculo del score de prácticas se basó en 8 ítems del cuestionario (Tabla S3: 2-7, 9, 11), con un mínimo de 0 y un máximo de 14 puntos. Un score bajo indica hábitos o conductas de riesgo, mientras que un score alto indica prácticas más seguras. La frecuencia con que se realizan actividades como la pesca, caza o manipulación de ganado, recolección de leña y desmalezado se categorizó en: frecuentemente (al menos una vez a la semana), raramente (menos de una vez al mes) o nunca, asignándoles un puntaje entre 0 y 2 respectivamente. Si el encuestado realizaba dichas actividades descalzo, se restaron 2 puntos del score de prácticas, si utilizaba calzado permeable se restó 1 punto y si utilizaba botas de goma o wader no se restaron puntos. Se sumó un punto al score de prácticas cada vez que el encuestado indicó evitar situaciones de riesgo como: ir a las islas fluviales, pernoctar en las islas, atravesar cuerpos de agua estancada descalzo, usar agua del río para consumo o limpieza y nadar en el río.



Figura 2.2. Sitios de estudio al momento de la encuesta. (A) Niños jugando en un basural cercano al centro de evacuados de La Vuelta del Paraguay; (B) Vivienda inundada en Colastiné Sur; (C) Residentes auto-evacuados en Los Zapallos.

El cálculo de los scores de conocimientos y actitudes estuvo restringido a aquellos encuestados que informaron haber escuchado sobre leptospirosis. El score de conocimientos se basó en 7 ítems del cuestionario (Tabla S3: 23-28), aumentando en función de los conocimientos del encuestado, con un mínimo de 0 y un máximo de 22 puntos. Se cubrieron aspectos generales de la enfermedad, síntomas, modos de transmisión y medidas preventivas, mediante preguntas abiertas que permitían respuestas múltiples. Las mismas se puntuaron como la suma de las respuestas correctas menos las respuestas incorrectas. Se incluyeron también preguntas cerradas, puntuadas como 1 si el encuestado respondió “Sí” y 0 si respondió “No/No sabe”.

El score de actitudes aumentó en la medida que el encuestado mostrara mayor conciencia del riesgo y tendencia a actuar ante un brote epidémico o ante síntomas de la enfermedad. Se basó en 7 ítems del cuestionario (Tabla S3: 16-17, 29-33), con un mínimo de 0 y un máximo de 13 puntos. Las preguntas incluyeron percepciones sobre la prevalencia de leptospirosis en el área y reacciones frente a un eventual brote, puntuadas de 0 a 2, preguntas sobre el riesgo percibido de leptospirosis en comparación al dengue y la propensión a buscar atención médica en caso de síntomas febriles. Estas preguntas se puntuaron de 0 a 1. Los scores crudos de conocimientos, actitudes y prácticas se expresaron en porcentajes dividiéndolos por el máximo posible para cada categoría y multiplicando por 100.

ANÁLISIS DE DATOS

Los datos se ingresaron en Microsoft Access [®] y se limpiaron y analizaron con R software (R Development Core Team, 2017). Los resultados se expresaron como frecuencias (%) para variables categóricas y como media (SD) o mediana (IQR) para los scores de CAP. La comparación de scores entre sitios se realizó por análisis de la varianza (ANOVA) con test de comparación múltiple de Tukey o por ANOVA Kruskal-Wallis con test de comparación de Dunn. El nivel de significancia estadística se estableció como $P \leq 0.05$.

Se evaluaron los factores asociados a prácticas preventivas mediante modelos lineales mixtos (LMM), con sitio como intercepto aleatorio, utilizando el paquete *lme4* (Bates y col., 2014). Se incluyeron en el análisis aquellos encuestados que habían oído hablar sobre leptospirosis, con datos socio-demográficos completos. El modelo saturado incluyó sexo, edad, nivel educativo, score de conocimientos y score de actitudes. Se consideraron además tres variables dummy: uso de (a) medios de comunicación (televisión, radio, periódicos, internet) o (b) centros de salud, como fuentes de información sobre leptospirosis, (c) si el encuestado conocía alguien que hubiera enfermado de leptospirosis. A partir de este modelo, se obtuvo una lista de modelos candidatos por un procedimiento

manual de step-backward según enfoque Kenward-Roger, utilizando el paquete *pbkrtest* (Halekoh y Højsgaard, 2014). Los modelos se compararon por criterio de información de Akaike de segundo orden (AICc) (Burnham y col., 2011) con el paquete *MuMIn* (Bartoń, 2017). Se seleccionó como modelo final, al más parsimonioso de los modelos candidatos con $\Delta AICc \leq 4$ respecto del modelo nulo. Se obtuvieron estimaciones de efectos fijos y aleatorios, reajustando el modelo por Restricted Maximum Likelihood (REML).

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS SOCIO-DEMOGRÁFICAS

Participaron de la encuesta 113 personas de los tres sitios de estudio, provenientes tanto de hogares evacuados (62.8 %) como no evacuados (37.2 %; [Tabla 2.1](#)). La mayoría de los encuestados fueron mujeres (61.1 %) y habían completado la escuela primaria (65.5 %; [Tabla 2.1](#)). Las edades de los encuestados estuvieron entre 12-77 años, con una mediana de 37 años (IQR: 27-52). El 58.4 % de los encuestados fueron amas de casa, desempleados, jubilados y estudiantes. Entre quienes trabajaban fuera de su casa, 15.9 % eran pescadores de subsistencia, 5.3 % trabajaban en construcción a pequeña escala y 23 (20.4 %) se dedicaban al comercio, servicio doméstico, empleo municipal u otras actividades ([Tabla 2.1](#)).

CONOCIMIENTOS, ACTITUDES Y PRÁCTICAS

Del total de encuestados, 83.2 % informó haber escuchado previamente sobre leptospirosis, sin observarse diferencias significativas entre sitios ($P = 0.099$). Aproximadamente la mitad (47.9 %) de los encuestados que oyeron hablar sobre leptospirosis conocieron a alguien que tuvo la enfermedad. La frecuencia fue significativamente mayor ($P < 0.001$) en el sitio VP (83.3 %) respecto a CS (40 %) y LZ (30 %). La mayoría de los encuestados sabía que la leptospirosis tiene cura (72.3 %), observándose diferencias significativas ($P = 0.010$) entre los sitios VP (95.8 %), CS (70 %) y LZ (56.7 %). La mayoría de los encuestados también sabía que la leptospirosis puede ser mortal (80.9 %), con diferencias significativas ($P = 0.006$) entre los sitios CS (92.5 %), VP (87.5 %) y LZ (60 %). La leptospirosis fue identificada frecuentemente (71.3 %) como una enfermedad asociada a las ratas. Se observaron diferencias significativas ($P = 0.001$) en la frecuencia entre sitios, siendo menor en LZ (46.7 %), respecto a CS (87.5 %) y VP (75 %). Los síntomas identificados con mayor frecuencia fueron fiebre (55.3 %) y dolor de cabeza (26.6 %; [Fig. 2.3](#)).

La tercera parte de los encuestados (29.8 %), no fue capaz de identificar algún modo de transmisión. Los demás, identificaron en su mayoría a las ratas y ratones como animales hospedadores (79.8 %) y la orina de estos animales como el principal modo de transmi-

Tabla 2.1. Frecuencias (%) de características socio-demográficas y estado de evacuación de los encuestados (n = 113)

Variable	VP n = 26	CS n = 46	LZ n = 41	Total n = 113
Sexo				
Femenino	15 (57.7)	27 (58.7)	27 (65.9)	69 (61.1)
Masculino	11 (42.3)	19 (41.3)	14 (34.1)	44 (38.9)
Grupo etario (años)				
<18	1 (3.8)	5 (10.9)	5 (12.5)	11 (9.8)
18-29	3 (11.5)	9 (19.6)	8 (20.0)	20 (17.9)
30-44	10 (38.5)	15 (32.6)	11 (27.5)	36 (32.1)
45-64	8 (30.8)	13 (28.3)	13 (32.5)	34 (30.4)
≥65	4 (15.4)	4 (8.7)	3 (7.5)	11 (9.8)
Nivel educativo				
Sin instrucción	5 (19.2)	5 (10.9)	11 (26.8)	21 (18.6)
Primario	18 (69.2)	31 (67.4)	25 (61.0)	74 (65.5)
Secundario	3 (11.5)	10 (21.7)	3 (7.3)	16 (14.2)
Sin datos	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (4.9)	2 (1.8)
Ocupación				
Empleado	6 (23.1)	12 (26.1)	5 (12.2)	23 (20.4)
Albañil	1 (3.8)	4 (8.7)	1 (2.4)	6 (5.3)
Pescador	3 (11.5)	4 (8.7)	11 (26.8)	18 (15.9)
Estudiante	1 (3.8)	5 (10.9)	7 (17.1)	13 (11.5)
Ama de casa/Desempleado/Jubilado	15 (57.7)	21 (45.7)	15 (36.6)	51 (45.1)
Sin datos	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (4.9)	2 (1.8)
Evacuado				
No	1 (3.8)	22 (47.8)	19 (46.3)	42 (37.2)
Sí	25 (96.2)	24 (52.2)	22 (53.7)	71 (62.8)

VP: La Vuelta del Paraguay; CS: Colastiné Sur; LZ: Los Zapallos

sión (46.8%; Fig. 2.3). Un 36.2% de los encuestados no fue capaz de identificar medidas preventivas, mientras que solo 5.3% de los encuestados que identificaron medidas preventivas mencionó evitar el contacto con agua estancada (Fig. 2.3). El score de conocimientos promedio fue de 33.9% (SD ± 15.9%), el test ANOVA mostró diferencias significativas entre sitios (P<0.001), siendo mayor en los sitios VP (42.6%, SD ± 14.6) y CS (37.5%, SD ± 13.3%) con respecto al sitio LZ (22.3%, SD ± 13.5%).

Cuando se les preguntó acerca de dónde habían oído hablar sobre leptospirosis, casi la mitad de los encuestados (48.9%) reportó utilizar los medios (televisión, radio, periódicos, internet) como fuente de información. Les siguieron en orden de importancia los servicios de salud (36.2%), familiares o vecinos (29.8%) y escuelas (14.9%).

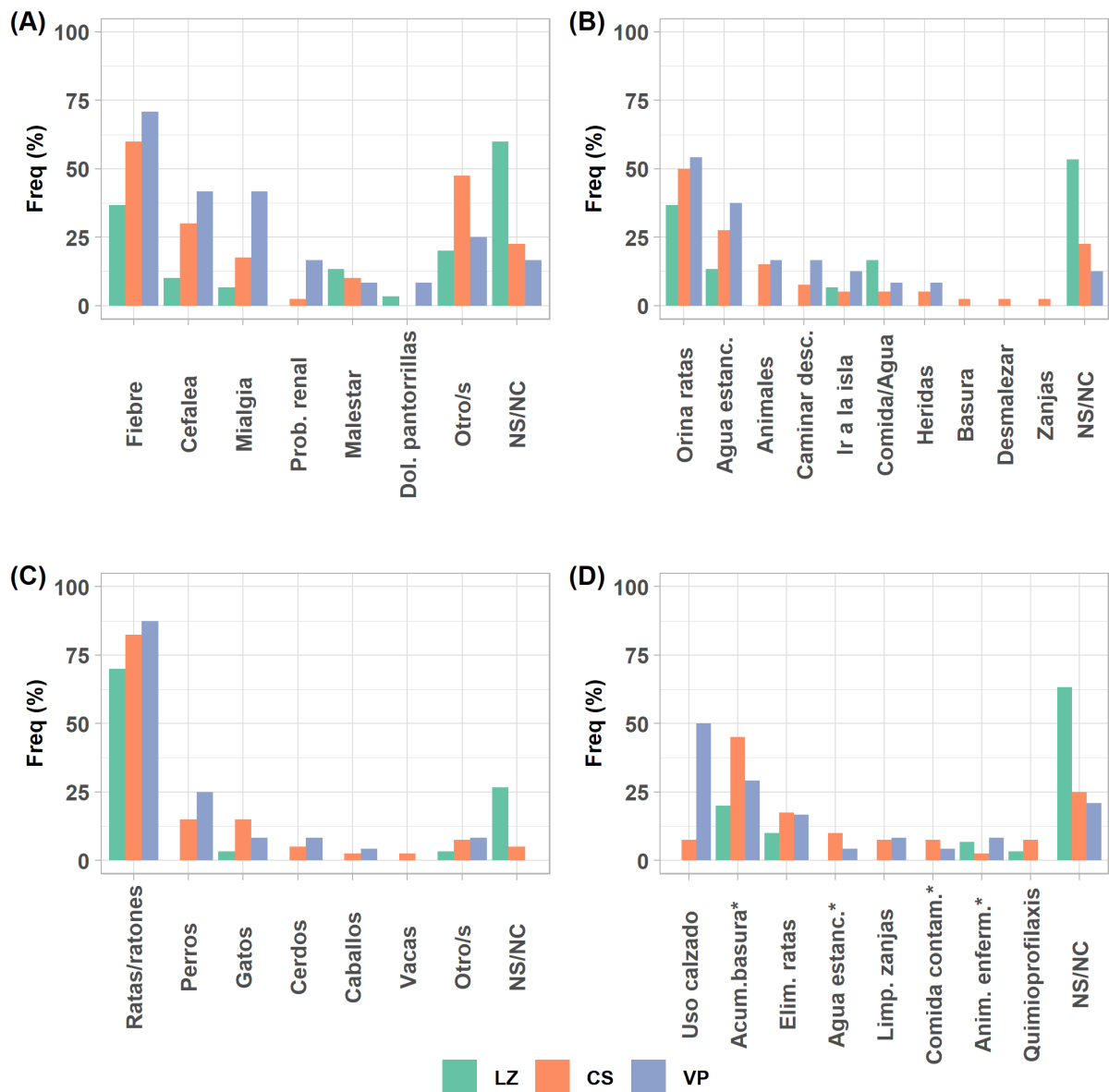


Figura 2.3. Conocimientos acerca de leptospirosis entre los encuestados que habían oído hablar sobre la enfermedad ($n = 94$). (A) Síntomas; (B) Modos de transmisión ambiental; (C) Animales hospedadores; (D) Medidas preventivas. VP: La Vuelta del Paraguay; CS: Colastiné Sur; LZ: Los Zapallos. *Evitar

En cuanto a las actitudes sobre leptospirosis, 52 (55.3%) encuestados manifestaron creer que hay pocos casos por año, pero 57 (60.6%) consideraron que podría haber un brote epidémico (Tabla 2.2). Cuando se les preguntó como reaccionarían ante un posible brote, 53 (56.4%) encuestados respondieron que tendrían miedo de infectarse y 80 (85.1%) que podrían adoptar medidas preventivas. La mayor parte de los encuestados consideró que el dengue tiene mayor prevalencia que la leptospirosis en el área (59.6%). Sin embargo, no hubo una distinción notable sobre cómo percibieron el riesgo de estas enfermedades: aproximadamente un tercio de los encuestados se sentía en mayor riesgo de contraer leptospirosis, un tercio en mayor riesgo de contraer dengue y un tercio en

igual riesgo para ambas enfermedades (Tabla 2.2). Mientras un 55.3% de los encuestados consideraba que el dengue era una enfermedad más severa que la leptospirosis, el 17% las consideró igualmente graves (Tabla 2.2). Entre los 94 encuestados, 16% no fueron capaces de responder sobre la prevalencia de ambas enfermedades en la zona, 12.8% no fueron capaces de responder a cual de las dos se sentían más expuestos y 7.4% no fueron capaces de responder sobre que tan graves consideraban al dengue y la leptospirosis (Tabla 2.2). Por otro lado, se observó que la mayoría de los encuestados buscan atención médica con regularidad (77%), y que 96.4% iría al médico en caso de fiebre persistente. El score de actitudes tuvo una mediana de 76.9% (IQR 30.8-100%) y el ANOVA Kruskal-Wallis no encontró diferencias significativas entre sitios ($P = 0.26$).

Tabla 2.2. Frecuencia (%) de actitudes acerca de leptospirosis entre los encuestados que oyeron hablar sobre la enfermedad ($n = 94$)

Variable	VP n = 24	CS n = 40	LZ n = 30	Total n = 94
¿Cuántos casos se reportan al año?				
Muchos casos	9 (37.5)	13 (32.5)	2 (6.7)	24 (25.5)
Pocos casos	9 (37.5)	22 (55.0)	21 (70.0)	52 (55.3)
No sabe	6 (25.0)	5 (12.5)	7 (23.3)	18 (19.1)
¿Puede haber un brote epidémico?				
No	2 (8.3)	11 (27.5)	7 (23.3)	20 (21.3)
Sí	21 (87.5)	22 (55.0)	14 (46.7)	57 (60.6)
No sabe	1 (4.2)	7 (17.5)	9 (30.0)	17 (18.1)
¿Cuál es más prevalente?				
Leptospirosis	5 (20.8)	6 (15.0)	2 (6.7)	13 (13.8)
Dengue	8 (33.3)	27 (67.5)	21 (70.0)	56 (59.6)
Ambas	4 (16.7)	3 (7.5)	3 (10.0)	10 (10.6)
No sabe	7 (29.2)	4 (10.0)	4 (13.3)	15 (16.0)
¿A cual está más expuesto?				
Leptospirosis	8 (33.3)	12 (30.0)	8 (26.7)	28 (29.8)
Dengue	10 (41.7)	13 (32.5)	7 (23.3)	30 (31.9)
Ambas	5 (20.8)	12 (30.0)	7 (23.3)	24 (25.5)
No sabe	1 (4.2)	3 (7.5)	8 (26.7)	12 (12.8)
¿Cuál es más severa?				
Leptospirosis	6 (25.0)	7 (17.5)	6 (20.0)	19 (20.2)
Dengue	13 (54.2)	23 (57.5)	16 (53.3)	52 (55.3)
Ambas	4 (16.7)	7 (17.5)	5 (16.7)	16 (17.0)
No sabe	1 (4.2)	3 (7.5)	3 (10.0)	7 (7.4)

VP: La Vuelta del Paraguayo; CS: Colastiné Sur; LZ: Los Zapallos

En cuanto a prácticas preventivas, 48.7% de los 113 encuestados informaron nunca

pescar, 83.2% nunca cazar o manipular ganado, 64% nunca desmalezar y 54.9% nunca recolectar leña. Se observaron diferencias entre hombres y mujeres en la frecuencia con que se va a pescar y cazar (Tabla S4). De 85 encuestados que informaron realizar una o más de estas actividades, 51.8% utilizaban calzado permeable, 42.4% botas o wader y 5.9% iban descalzos. Con respecto a la prevención de prácticas de riesgo, 51.3% informaron que no iban a las islas fluviales, 64.6% que no pasaban la noche en las islas. Veintiséis encuestados (23%) informaron que no suelen atravesar charcos de agua estancada, 39.8% que no suelen mojarse los pies con agua estancada, 69% que no suelen usar agua estancada o del río para limpieza y consumo y 58.4% que no suelen nadar en el río o agua estancada (Fig. 2.4). Se observaron diferencias entre hombres y mujeres en la frecuencia con que se evitaba realizar o exponerse a algunas prácticas de riesgo (Fig. 2.4 y Tabla S4). El score de prácticas tuvo una mediana de 57.1% (IQR 0-100%) y el ANOVA Kruskal-Wallis no encontró diferencias significativas entre sitios ($P = 0.08$).

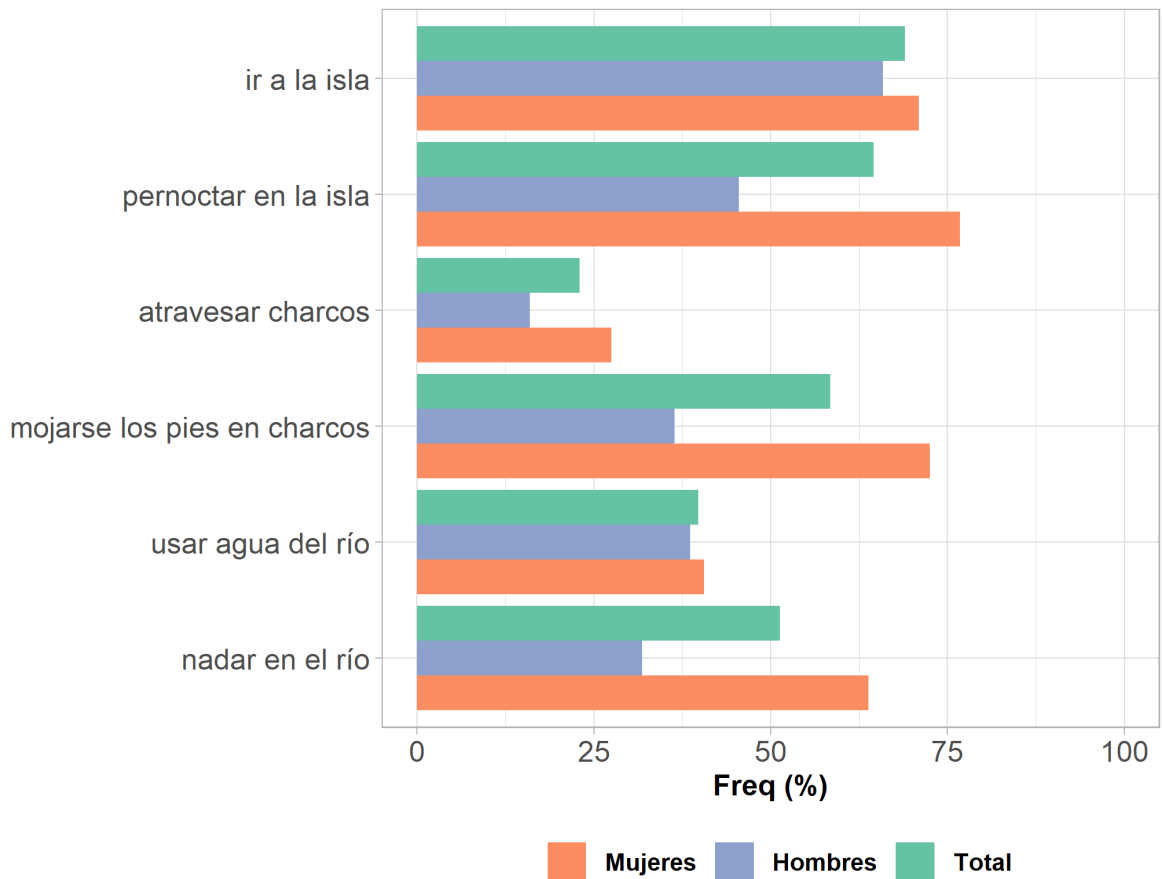


Figura 2.4. Actividades de riesgo evitadas según sexo de los encuestados ($n = 113$).

FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LAS PRÁCTICAS PREVENTIVAS

La adhesión a prácticas preventivas se evaluó modelando el score de prácticas en función de 9 variables independientes. Las mismas incluyeron: sexo, edad, nivel educativo

alcanzado, si el encuestado trabajaba fuera de su casa, uso de los medios de comunicación o centros de salud como fuentes de información sobre leptospirosis, si el encuestado conoce alguien que haya tenido leptospirosis, score de conocimientos y score de actitudes. El procedimiento manual de step-backward produjo una lista de 10 modelos a partir de cuales se seleccionó el más parsimonioso (Tabla 2.3). En este modelo, el score de prácticas estuvo asociado positivamente al score de conocimientos y negativamente al sexo masculino (Tabla 2.4). Los efectos fijos explicaron 28.4% de la variación, mientras que la combinación de efectos fijos y aleatorios explicó 29.9% de la variación (Tabla 2.4). Los residuos tuvieron distribución normal, observándose un valor outlier (Fig. S4). Para descartar un potencial sesgo debido a la edad, se corrieron los modelos para un subconjunto de la muestra que excluía a los menores de 18 años ($n = 84$), llegándose a los mismos resultados que para la muestra completa (Tabla S5).

Tabla 2.3. Lista de modelos lineales mixtos candidatos a explicar la variabilidad en el score de prácticas, usando sitio como intercepto aleatorio ($n = 92$)

Modelo	AICc	Δ AICc	Wi	logLik	K
Sexo + CSAL + Conocimientos	837.50	0.00	0.35	-412.26	6
Sexo + Conocimientos	838.12	0.62	0.26	-413.71	5
Sexo + CSAL + Medios + Conocimientos	838.60	1.10	0.20	-411.63	7
Sexo + Ocupado + CSAL + Medios + Conocimientos	839.77	2.26	0.11	-411.02	8
Sexo + Ocupado + CSAL + Medios + CALG + Conocimientos	841.34	3.83	0.05	-410.57	9
Sexo	844.30	6.79	0.01	-417.92	4
Sexo + Educación + Ocupado + CSAL + Medios + CALG + Conocimientos	844.79	7.28	0.01	-409.74	11
Sexo + Educación + Ocupado + CSAL + Medios + CALG + Conocimientos + Actitudes	846.89	9.39	0.00	-409.47	12
Modelo saturado	849.16	11.66	0.00	-409.25	13
Modelo nulo	865.21	27.70	0.00	-429.47	3

AICc: criterio de información de Akaike de segundo orden;
 Δ AICc: diferencia en el AICc entre el modelo candidato y el mejor modelo;
Wi: pesos de Akaike; logLik: log-verosimilitud; K: número de parámetros
CSAL: uso de los centros de salud como fuente de información sobre leptospirosis;
CALG: el encuestado conoce alguien que tuvo leptospirosis;

DISCUSIÓN

Hasta donde se tiene conocimiento, este es el primer estudio que describe los conocimientos, actitudes y prácticas preventivas asociadas con leptospirosis en Argentina. El

Tabla 2.4. Estimación de parámetros para los coeficientes del modelo más parsimonioso del score de prácticas con sitio como intercepto aleatorio (n = 92)

Predictor	Coefficiente	95 % CI
(Intercepto)	46.48*	34.30 – 58.67
Sexo: Masculino	-25.50*	-34.66 – -16.35
Score de conocimientos	0.47*	0.17 – 0.77
Efectos aleatorios		
σ^2		481.67
$\tau_{00 \text{ sitio}}$		9.88
ICC_{sitio}		0.02
R ² Marginal/ Condicional	0.284	0.299

σ^2 : varianza residual; $\tau_{00 \text{ sitio}}$: varianza efecto aleatorio; ICC: correlación intra-clases;* $P \leq 0.05$

mismo, realizado en asentamientos ribereños de la provincia de Santa Fe, provee información relevante acerca del riesgo de leptospirosis en comunidades de un área endémica altamente vulnerable a inundaciones (Vanasco y col., 2000; Vanasco y col., 2002; Vanasco y col., 2008; MSAL, 2012b; Cudós y col., 2013; Cudós y col., 2014). La mayoría de los encuestados (83.2 %) había oído hablar sobre leptospirosis, sin embargo, muchos de ellos no fueron capaces de describir los síntomas (33 %), modos de transmisión (29.8 %) o medidas de prevención (36.2 %). Resulta fundamental aumentar el conocimiento sobre estos aspectos en los residentes de dichos asentamientos, a fin de que se encuentren mejor preparados para evitar la infección o el progreso de la enfermedad. Estudios realizados en Chile (Mason y col., 2015), Filipinas (Arbiol y col., 2016), Trinidad (Mohan y Chadee, 2011), Malasia (Mohd Rahim y col., 2012; Sakinah y col., 2015) y Sri Lanka (Agampodi y col., 2010) llegaron a conclusiones similares.

En cuanto al reconocimiento de factores de riesgo de leptospirosis, solo un 25.5 % de los encuestados mencionó el contacto con agua estancada como modo de transmisión. Si se tiene en cuenta que este es el principal factor de riesgo de leptospirosis en la región (Vanasco y col., 2000; Vanasco y col., 2008; CCLA - AAVLD, 2002; MSAL, 2012b), resulta preocupante hallar que solo una pequeña fracción de la población tenga conocimiento de ello. Estas comunidades poseen calles de tierra y alcantarillas a cielo abierto (“zanjas”), que la mayor parte del tiempo contienen agua estancada. Durante períodos de lluvias intensas, se forman charcos en las calles de tierra en los que se mezcla el agua de lluvia con el de las zanjas. En las comunidades estudiadas es una practica común cruzar estos charcos descalzo (60.2 %), incrementando el riesgo de infección.

Muchos de los encuestados trabajan en el sector informal, principalmente en actividades al aire libre como la pesca, la caza o la jardinería y la mitad de ellos no utiliza calzado

apropiado. En otros estudios se ha observado que es frecuente que no se utilice equipo de protección, ya sea por dificultades en adquirirlo o porque las personas lo consideran incómodo (Navegantes De Araújo y col., 2013; Agampodi y col., 2010; Sakinah y col., 2015). En los sitios de estudio, se puede fomentar el uso de calzado apropiado si se logra concientizar a los residentes de que la leptospirosis puede adquirirse por contacto con agua estancada.

La leptospirosis es conocida en la región como “la enfermedad de las ratas”, ya que la gente considera que estos animales tienen un papel fundamental en la transmisión. En este estudio, 79.8 % de los encuestados mencionó a las ratas como fuente de leptospirosis en humanos. En consistencia con estudios previos (Agampodi y col., 2010; Abiayi y col., 2015; Sakinah y col., 2015), solo un pequeño porcentaje de encuestados identificó a perros (12.8 %), vacas y cerdos (5.4 %) como fuentes animales de leptospirosis. Esto genera especial preocupación considerando que en la mayor parte de los hogares se cuenta con uno o varios de estos animales. Además, solo una pequeña proporción de los perros se vacuna regularmente contra leptospirosis (Chiani, 2013; Mason y col., 2015) y se ha aislado *Leptospira* serovar Canicola en casos graves de leptospirosis (Cudós y col., 2014; Chiani y col., 2016).

La mayor parte de los encuestados respondió que ocurren unos pocos casos de leptospirosis por año en la provincia de Santa Fe, pero que existe la posibilidad de un brote epidémico. Esta percepción concuerda con los datos publicados por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica por Laboratorios de Argentina (SIVILA). Entre las semanas epidemiológicas 1-20 de 2016 se confirmaron 27 casos de leptospirosis, 12 de los cuales ocurrieron en el departamento La Capital, donde se ubica el área de estudio (MSAL, 2016b, 2016c; INER, 2016). Sin embargo, teniendo en cuenta la diversidad de manifestaciones clínicas de la enfermedad y las limitaciones del diagnóstico en laboratorio, es probable que se esté subestimando el número de casos (Cudós y col., 2014; Chiani y col., 2016).

La similitud de los síntomas y las condiciones ambientales para la transmisión con el dengue, probablemente contribuyen a la subestimación del número de casos de leptospirosis (LaRocque y col., 2005; Libraty y col., 2007; Mohan y Chadee, 2011; Sakinah y col., 2015; MSAL, 2016a). Los brotes de dengue durante las inundaciones, como el ocurrido durante la inundación del río Paraná de 2016 (MSAL, 2016b), pueden llevar a que los casos de leptospirosis se diagnostiquen erróneamente como dengue. En 2016, se reportaron 1324 casos de dengue en la provincia de Santa Fe entre las semanas epidemiológicas 1-20 (MSAL, 2016b). La encuesta se realizó durante este brote, mientras se llevaba a cabo una campaña masiva para advertir al público sobre el riesgo de dengue. Con este panorama, fue sorprendente hallar que 30 % de los encuestados consideraron que tenían mayor

riesgo de contraer leptospirosis y que 25.5% consideraron estar igualmente expuestos a ambas enfermedades. Finalmente, otro factor que puede llevar a subestimar el número de casos de leptospirosis, es el hecho de que las condiciones ambientales en estas comunidades ribereñas restringe el acceso a la atención médica y los diagnósticos de laboratorio.

En general, el conocimiento sobre leptospirosis parece disminuir a medida que nos alejamos de la ciudad de Santa Fe. Esto podría atribuirse a una mayor distancia a los hospitales y un acceso más limitado a la información por parte de los pobladores rurales (Sanders y col., 1999; Teferi y Shewangizaw, 2015; Heshmat y col., 2016). Durante la realización de las encuestas, un alto porcentaje (68.3%) de residentes de Los Zapallos manifestó tener que trasladarse a hospitales o sanatorios privados de la ciudad de Santa Fe o de la comuna de Santa Rosa de Calchines, situadas a 30 y 15km del asentamiento, respectivamente. Aunque todos residan en asentamientos con condiciones de vida similares, estas diferencias no se observaron en cuanto a las actitudes y prácticas de los residentes.

Los modelos propuestos para explicar la variación en el uso de prácticas preventivas, sugieren que los hombres tienen un mayor riesgo de contraer leptospirosis que las mujeres. A diferencia de los hombres, la mayoría de las mujeres encuestadas dijeron no ir a pescar (63.8%), a cazar (94.2%) o a la isla (63.8%), no pernoctar en la isla (76.8%), y no nadar en el río o agua estancada (72.5%; [Tabla S4](#)). En otras actividades, como recolectar leña, desmalezar y atravesar charcos, no se observaron diferencias significativas entre sexos ([Tabla S4](#)). También encontramos que gran parte de los hombres (31.8%) se dedicaba a la pesca y la mayoría de las mujeres eran amas de casa o desempleadas (63.8%). Esto concuerda con otros estudios que encontraron una mayor probabilidad de infección en los hombres, explicando esta diferencia en base a la mayor participación de los hombres en actividades recreativas o laborales a la intemperie (Vanasco y col., 2000; Reis y col., 2008; Cudós y col., 2014; Agampodi y col., 2010; Haake y Levett, 2015; Sakinah y col., 2015; Arbiol y col., 2016; Lau y col., 2016).

Se observó además, que la probabilidad de adoptar prácticas preventivas aumentaba con el conocimiento sobre la enfermedad. La mayoría de los estudios sobre CAP asociados a leptospirosis son descriptivos, y no intentan identificar factores que puedan influir en la predisposición a adoptar prácticas preventivas (Barkat y col., 1995; Mohan y Chadee, 2011; Mohd Rahim y col., 2012; Navegantes De Araújo y col., 2013; Agampodi y col., 2010; Sakinah y col., 2015). Los resultados obtenidos fueron consistentes con los de Arbiol y col. (2016) y Lau y col. (2016). También coinciden con otros estudios sobre prácticas de prevención de enfermedades zoonóticas, que muestran que un mayor conocimiento sobre la enfermedad da como resultado una mayor adopción de prácticas preventivas (Davlin y col., 2014; Lugova y Wallis, 2017).

Los hallazgos deben considerarse dentro de las limitaciones del estudio. La composición relativamente homogénea de la muestra puede haber influido en la importancia de los parámetros socio-demográficos sobre las prácticas preventivas. Otra limitación del estudio fue el pequeño tamaño de la muestra y que la misma no estuvo distribuida proporcionalmente por sexo y por la población de cada sitio, lo que puede haber impedido detectar un efecto significativo de otras variables socio-demográficas. En cuanto a generalización, las conclusiones solo pueden extrapolarse a comunidades similares de la región, donde la pesca de subsistencia sea una ocupación común entre los residentes.

Los resultados de este estudio sugieren que aumentar el conocimiento sobre leptospirosis es clave para promover conductas más saludables en la comunidad, en lugar de intentar cambiar las actitudes con respecto a la leptospirosis. Por lo tanto, es importante implementar una amplia gama de actividades de información, educación y comunicación para lograr una mejor comprensión de los síntomas, el tratamiento y la prevención de la leptospirosis por parte de los distintos actores involucrados. La educación sanitaria debe llegar tanto a los equipos de salud como al público en general, particularmente a los grupos de riesgo. En estas comunidades ribereñas, el mayor desafío es identificar estrategias para llegar al principal grupo de riesgo: hombres que trabajan y/o realizan actividades recreativas a la intemperie y pasan tiempo en campamentos precarios en las islas fluviales. En este sentido, un enfoque innovador es el desarrollo de campañas de marketing social para llegar al público y “promover cambios de comportamientos beneficiosos para la sociedad” (Grier y Bryant, 2005). Esta estrategia se aplicó con éxito para incrementar la conciencia mundial sobre el Chagas, en una campaña que involucró a deportistas y artistas famosos (<http://beatchagas.org/>). Estas campañas deben diseñarse para comunidades específicas, dado que los impedimentos para adoptar prácticas preventivas varían de una comunidad a otra (Mason y col., 2015). Para el presente estudio, se elaboró un folleto informativo adaptado a las comunidades ribereñas (Fig. S3), que se distribuyó y explicó después de completar la encuesta. Además se ofrecieron talleres de extensión para las escuelas locales. Estas instancias proporcionaron oportunidades para intercambiar ideas sobre prácticas preventivas que resultaran más alcanzables.

Resultaría necesario formar equipos interdisciplinarios compuestos por personal médico, investigadores, pobladores y autoridades gubernamentales, que identifiquen y mejoren el acceso público a información sobre prácticas preventivas y atención médica. Los enfoques interdisciplinarios sobre problemas de salud pública, promueven una mejor comprensión de los mismos y brindan soluciones integrales para distintas situaciones (Parkes y col., 2005; Sanmartino y col., 2015). Para que estos equipos desarrollen políticas y campañas de salud pública más efectivas, se necesita acceder a datos epidemiológicos y socio-culturales

de calidad (Bardosh, [2014](#); Costa y col., [2015a](#)).

CAPÍTULO 3

EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE LEPTOSPIRAS PATÓGENAS EN ROEDORES SILVESTRES Y SINANTRÓPICOS

El contenido parcial de este capítulo fue publicado en:

Ricardo T, Monje LD, Landolt N, Chiani YT, Schmeling MF, Beldoménico PM, Vanasco NB y Previtali MA. 2018b. «Primer informe de *Leptospira interrogans* en el roedor sigmodontino *Scapteromys aquaticus*». *Rev Panam Salud Publica* 42: e83.

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica re-emergente de distribución mundial causada por espiroquetas del género *Leptospira* (Levett, 2001; WHO, 2003). Las leptospiras patógenas se excretan con la orina de animales infectados hacia el ambiente, donde pueden persistir entre semanas y meses e infectar al ser humano (WHO, 2003; Trueba y col., 2004; Adler y de la Peña Moctezuma, 2010; Wynwood y col., 2014).

A pesar de que todas las variedades de leptospiras patógenas pueden infectar a cualquier animal, los distintos serotipos suelen ser endémicos de una región y mantenidos por un número limitado de especies reservorio (Levett, 2001; WHO, 2003; Adler y de la Peña Moctezuma, 2010; Ellis, 2015; Dietrich y col., 2018). Los roedores constituyen un grupo importante de animales reservorio, por su capacidad de desarrollar infecciones asintomáticas y excretar leptospiras crónicamente a través de la orina (Levett, 2001; Bharti y col., 2003; Adler y de la Peña Moctezuma, 2010; Himsforth y col., 2013b; Ellis, 2015). Estos animales, suelen buscar refugio y alimento en áreas antropizadas urbanas y rurales, incrementando las probabilidades de contacto con humanos o animales domésticos, y el riesgo de infección (Rothenburger y col., 2017; Torres-Castro y col., 2018). La transmisión a humanos puede verse influenciada, además, por condiciones climáticas que influyan sobre la conducta de los animales reservorio y la persistencia en el ambiente (Himsforth y col., 2013b; Lovera y col., 2017; Rothenburger y col., 2017, 2018; Millán y col., 2018).

En Argentina, así como en otros países latinoamericanos, los residentes de asentamientos marginales presentan alto riesgo de infección con leptospirosis (Arango y col., 2001; Reis y col., 2008; Costa y col., 2015b). Los principales factores de exposición son servicios sanitarios deficientes, hacinamiento y contacto prolongado con ambientes inundados, que a su vez favorecen el contacto con animales reservorio (Arango y col., 2001; Reis y col., 2008; MSAL, 2014; Costa y col., 2015b; Schneider y col., 2017). La provincia de Santa Fe presenta altas incidencias anuales de leptospirosis y brotes epidémicos durante períodos de lluvias intensas o inundaciones (Vanasco y col., 2000; Vanasco y col., 2002; Vanasco y col., 2008; CCLA - AAVLD, 2002; Musacchio y col., 2010; Cudós y col., 2013).

La provincia de Santa Fe cuenta con varias especies de micromamíferos nativos, entre los que se puede mencionar a roedores de las familias Caviidae y Cricetidae (Gómez Villafañe y col., 2005; Barquez y col., 2006). Además, están presentes roedores invasores de las familias Muridae (*Rattus norvegicus*, *Rattus rattus*, *Mus musculus*) y Sciuridae (*Callosciurus erythraeus*). Sin embargo, unos pocos estudios descriptivos han indagado sobre la presencia de leptospiras patógenas en roedores de la región (Marder y col., 2008; Scialfa y col., 2010; Gozzi y col., 2013; Grune Loffler y col., 2014b; Colombo y col., 2018;

Ricardo y col., 2018b). Dos estudios adicionales intentaron establecer asociaciones entre las infecciones de los roedores y variables ambientales o características de los animales. En el primero se encontraron asociaciones con especie y edad de los roedores (Vanasco y col., 2003), mientras que en el segundo las asociaciones fueron con abundancia de micromamíferos y precipitaciones (Lovera y col., 2017). Los objetivos de este trabajo fueron evaluar la presencia de leptospiras patógenas y anticuerpos contra las mismas en roedores silvestres y sinantrópicos de asentamientos marginales ribereños cercanos a la ciudad de Santa Fe e identificar factores que aumenten la probabilidad de infección.

MATERIALES Y MÉTODOS

SITIOS DE ESTUDIO

La ciudad de Santa Fe (31°38'0"S, 60°42'0"O), capital de la provincia de Santa Fe, está situada en el noreste de Argentina, en la unión de los ríos Paraná y Salado y cuenta con clima subtropical húmedo. Se seleccionaron tres comunidades cercanas a la ciudad de Santa Fe, situadas en el valle de inundación del río Paraná, un área altamente vulnerable a inundaciones y con diferentes niveles de deficiencia en infraestructura sanitaria. Las comunidades comprendieron dos vecindarios ribereños de Santa Fe (AV: Alto Verde, CS: Colastiné Sur) y un asentamiento situado a 30 km NE de la ciudad (LZ: Los Zapallos).

En cada comunidad, se establecieron tres sitios de estudio, separados entre sí por cuerpos de agua y una distancia de entre 1.5 y 3.5 km (Fig. 3.1). Los sitios centro (C) consistieron en áreas suburbanas con densidad poblacional intermedia, presencia de microbasurales, alcantarillas a cielo abierto ("zanjas") y pastizales. Los sitios borde (B) consistieron en áreas de baja densidad poblacional, con grandes parches de flora nativa. Los sitios naturales (N) consistieron en islas fluviales destinadas al pastoreo de vacas, cerdos y ovejas (Fig. 3.1).

MUESTREO DE MICROMAMÍFEROS

Entre septiembre de 2014 y octubre de 2015, se realizaron tres sesiones de trampeo de micromamíferos con frecuencia semestral, coincidiendo con el inicio de la primavera y del otoño. En cada sitio de cada comunidad se colocaron 25 estaciones de trampeo, divididas en 5 líneas de trampas y separadas entre sí por 15 m. Cada estación estuvo conformada por una trampa tipo Sherman y una trampa tipo jaula, cebadas con pellets de manteca de maní y avena o menudos de pollo, banana y maní respectivamente. Para incrementar el éxito de captura se roció la entrada de las trampas con una mezcla de aceite de cocina y esencia de vainilla. En los sitios centro y borde, las trampas se colocaron alrededor de



Figura 3.1. Sitios de estudio. (A) Ubicación de la provincia de Santa Fe en Argentina; (B) Ubicación del área de estudio dentro de la provincia de Santa Fe; (C) Ubicación de los sitios de muestreo de micromamíferos; (D-F) Tipos de ambiente relevados (centro, borde, natural). Los sitios centro se indican en magenta, los sitios borde en naranja y los sitios naturales en verde. Fuente: Mapa construido en QGIS Geographic Information System, a partir de imágenes satelitales LANDSAT8 OLI/TIRS ([U.S. Geological Survey](https://www.usgs.gov/)) y capas vectoriales [Natural Earth](https://www.naturalearthdata.com/).

viviendas y terrenos baldíos. Las trampas permanecieron activas durante tres noches, revisándolas diariamente por la mañana, reponiendo cebos y trampas con éxito de captura. Se registraron número de capturas, número de trampas saltadas (con captura de animales no objetivo o por fallas mecánicas), número de trampas abiertas pero sin cebo y número de trampas dañadas o perdidas.

Los animales capturados se anestesiaron profundamente por inhalación de isoflurano, y se les extrajo sangre por punción cardíaca para obtención de suero (Fig. 3.2). Dependiendo del tamaño del animal, se eutanizaron por dislocación cervical o sobredosis de anestesia. Se registraron peso (g), largo total (cm), largo de la cola (cm), largo de la pata trasera (mm), largo de la oreja (mm), sexo, madurez sexual y presencia de mordeduras (Fig. 3.2). Se consideraron sexualmente maduras las hembras con vagina perforada, mamas desarrolladas, presencia de embriones o cicatrices en el útero y los machos con testículos escrotales o vesículas seminales desarrolladas (Herbreteau y col., 2011). Los individuos se clasificaron en cinco grupos según su condición corporal (Fig. 3.2), siguiendo el protocolo de Hickman y Swan (2010). Se obtuvieron muestras de tejido de riñones, hígado, bazo, pulmón y corazón. Los sueros y tejidos se colectaron en tubos estériles de 1.5 ml, se transportaron en termo de Nitrógeno líquido y se almacenaron en ultrafreezer a -80°C .

De ser posible, el género y la especie se identificaron a campo y posteriormente se confirmaron por análisis morfológico del cráneo en el Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” (Fig. 3.2). En caso contrario, se enviaron muestras de tejido (hígado, pulmón o bazo) conservadas en alcohol 96° a colaboradores del Instituto Argentino de Zonas Áridas (IADIZA), para identificación molecular por genes mitocondriales (Hebert y col., 2003).

DETECCIÓN DE LEPTOSPIRAS PATÓGENAS POR MÉTODOS DIRECTOS

Por cada animal, se extrajo ADN a partir de 0.1-0.2 g de tejido renal utilizando Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, USA). Se midieron pureza y concentración de ADN en espectrofotómetro SPECTROStar® Nano con MARS Data Analysis Software (BMG Labtech, Germany), considerándose aceptable un coeficiente de absorbancia entre 1.8-2.0 y una concentración $\geq 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$.

Se utilizó el procedimiento de real-time PCR descrito en Stoddard y col. (2009) y modificado por Bourhy y col. (2011), utilizando un termociclador StepOne® (Applied Biosystems). El mismo, amplifica un segmento de 242 pb del gen *LipL32* y puede detectar leptospiaras patógenas de las genomoespecies *L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai* y *L. weilii* (Stoddard y col., 2009). La reacción tuvo un volumen final de 20 μl , conteniendo 4 μl de buffer Phire 5x, 200 μM dNTP, 0.4 pM de primers, 2 μl de 10x SYBR Green I (Invitrogen, USA), 150 ng de ADN y 0.4 μl de enzima Phire® Hot Start II (Thermofisher, USA). Las reacciones consistieron de una desnaturalización inicial de 3 min a 98°C , seguida de 40 ciclos de 5 seg a 98°C , 15 seg a 53°C y una extensión de 20 seg a 72°C . Se incluyeron un control positivo (150 ng



Figura 3.2. Procesamiento de micromamíferos. (A) Extracción de sangre por punción cardíaca; (B) Registro de parámetros morfométricos; (C) Evaluación de la condición corporal por palpación; (D) Análisis de características morfológicas del cráneo.

de ADN de *L. interrogans* serovar Canicola cepa Hond Utrecht IV, a concentración de 10^8 bacterias/ml) y un control negativo consistente en agua ultrapura.

Se descartó la presencia de inhibidores de la PCR amplificando un segmento de 285 pb del gen *18S*, en un subconjunto de muestras seleccionadas al azar, siguiendo el protocolo de Monje y col. (2016). Las muestras que resultaran negativas para este control interno, se descartaron del análisis. El ADN de *Leptospira*, se cuantificó mediante comparación de curvas de calibrado hechas a partir de diluciones seriadas entre 10^5 y 1 bacteria/ μ l de control positivo, en ensayos independientes. Para descartar falsos positivos, las muestras

que amplificaron para *LipL32* se volvieron a correr por triplicado.

Se enviaron muestras de tejido renal de los animales positivos a *LipL32* al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Dr. Emilio Coni” (INER) para cultivo. Los riñones se maceraron y sembraron en 8 ml de medio Ellinghausen-Mc-Cullough-Johnson-Harris (EMJH) semisólido. A los cultivos originales se les realizó un repique para aumentar la sensibilidad de la técnica y disminuir las contaminaciones. Los cultivos se incubaron a 28°C y se observaron en microscopio de campo oscuro diariamente la primer semana y mensualmente durante 4 meses (WHO, 2003; Chiani y col., 2016).

ELISA

Las muestras de suero se analizaron mediante un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) en el INER, siguiendo el protocolo de Vanasco y col. (2001). El antígeno sonicado se preparó a partir de cultivos del serovar Hardjo (Vanasco y col., 2016). El anticuerpo secundario consistió en una mezcla de cabra anti-rata IgG (Sigma) y cabra anti-hamster IgG (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.), permitiendo la detección de anticuerpos IgG en roedores múridos y sigmodontinos (Vanasco y col., 2001). Las muestras se analizaron por duplicado o triplicado y los resultados se expresaron como densidad óptica corregida (COD), que se obtiene dividiendo la densidad óptica de la muestra por el promedio de las densidades ópticas de los controles negativos (Vanasco y col., 2001; Vanasco y col., 2016). Se consideraron positivas las muestras con COD > 2.4. Este punto de corte equivale a una sensibilidad y especificidad del 100 %, comparado con el test de microaglutinación (MAT) a dilución 1:20 (Vanasco y col., 2001).

TIPIFICACIÓN

Las muestras de ADN de los animales positivos se analizaron en el INER para determinación de la especie de *Leptospira* presente. Se amplificó un segmento de 331 pb del gen *16S rRNA* (Merien y col., 1992) mediante PCR convencional, siguiendo el protocolo de Chiani y col. (2016). El primer paso de la PCR consistió en una desnaturalización de 3 min a 94°C, annealing de 90 seg a 63°C y extensión por 2 min a 72°C, seguido de 29 ciclos de 1 min a 94°C, 90 seg a 63°C y 2 min a 72°C. El último paso fue una extensión por 10 min a 72°C. Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa al 2 %.

A las muestras que amplificaron el gen *16S rRNA* se les aplicaron dos esquemas del método Multilocus Sequence Typing (MLST) (Boonsilp y col., 2013; Weiss y col., 2016). Los productos de secuenciación de PCR *16S rRNA* y MLST se purificaron utilizando GeneJET® PCR Purification Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) y se secuenciaron en Macrogen Inc (Seoul, Korea). Las secuencias se editaron, ensamblaron, alinearon

y analizaron según Chiani y col. (2016).

La tipificación serológica se realizó en el INER por Test de Microaglutinación (MAT). Considerando los pequeños volúmenes de suero obtenidos, se analizaron aquellos animales positivos para real-time PCR mediante un panel de 10 serogrupos frecuentes en el área y previamente empleados en la validación de la técnica ELISA IgG (Vanasco y col., 2001). Estos serogrupos (cepas de referencia) incluyeron: Castellonis (Castellón 3), Canicola (Hond Utrech IV), Grippytyphosa (Moskva V), Icterohaemorrhagiae (M20), Pomona (Pomona), Pyrogenes (Salinem), Tarassovi (Perepelicin), Sejroe (Wolfii 3705), Hardjo (Hardjoprajitno) y Hebdomadis (Hebdomadis) (Vanasco y col., 2001). Los animales se consideraron reactivos a la MAT cuando presentaron títulos de anticuerpos superiores o iguales a 1:25. El título de anticuerpos se determina cuando se produce la aglutinación del 50 % de las leptospiras libres.

ANÁLISIS DE DATOS

Los datos se ingresaron en LibreOffice Calc y se analizaron en software R (R Development Core Team, 2017). La abundancia de micromamíferos (AI) se estimó en términos de éxito de captura (individuos capturados por cada 100 trampas-noche). El número de trampas-noche se calculó como la suma de las trampas activas durante cada noche, menos las trampas perdidas o dañadas, menos 1/2 de las trampas saltadas (Nelson y Clark, 1973) o abiertas pero sin el cebo (Theuerkauf y col., 2011). Debido a que por su tamaño, algunas especies caen únicamente en un tipo de trampa, el éxito de captura se ajustó según tipo de trampa en que cae la especie (Lovera y col., 2017). Por cada sitio se calcularon riqueza (S), diversidad de especies (H') y abundancia relativa (pi). Se comparó la composición de la comunidad de micromamíferos de cada sitio mediante el índice de Chao (Chao y col., 2005). La matriz de similitud se representó mediante un dendrograma, construido por análisis de cluster con método de enlace simple, utilizando los paquetes *vegan* (Oksanen y col., 2017) y *heatmap* (Kolde, 2019).

Se evaluaron diferencias en la seroprevalencia según sitio de estudio, tipo de ambiente (borde, centro, natural) y especie mediante test χ^2 de Pearson o test exacto de Fisher (Hazra y Gogtay, 2016b). Se ajustaron modelos generalizados mixtos (GLMM) con estructura de error binomial para analizar efecto de la especie, sexo, madurez sexual, condición corporal (BCS), presencia de mordeduras, tipo de ambiente y variables climáticas sobre la probabilidad de infección (Easterbrook y col., 2007; Himsworth y col., 2013b; Cosson y col., 2014). Debido a que solamente se realizaron tres muestreos separados entre sí por 6 meses, no se consideró en el análisis la estación del año. La falta de independencia entre observaciones provenientes de un mismo sitio se modeló incluyendo al sitio como efecto

aleatorio. Considerando el tiempo requerido para el desarrollo de anticuerpos IgG en roedores, se estableció un desfase (*lag*) de dos semanas antes de la fecha de captura como la fecha última a partir de la que las infecciones podrían ser detectadas mediante ELISA. En base a esta fecha, se creó un set de variables climáticas incluyendo: (A) precipitación mensual (mm), temperatura (°C) máxima, media y mínima con desfases de 1-3 meses, (B) precipitación acumulada entre los 0-90 y 90-180 días previos, (C) temperatura mínima y máxima entre los 0-90 y 90-180 días previos. Los datos de temperatura y precipitación se obtuvieron promediando de los valores registrados en las estaciones meteorológicas de Ciudad Universitaria ([Centro de Informaciones Meteorológicas, UNL](#)), Alto Verde y Rincón ([Gestión de Riesgos, Gobierno de la ciudad de Santa Fe](#)). Se utilizó criterio de información de Akaike de segundo orden (AICc) para seleccionar las variables climáticas que mejor expliquen la presencia de anticuerpos contra leptospiras patógenas (Burnham y col., 2011). Como suele existir colinearidad entre variables climáticas, se analizó correlación entre pares de variables. Aquellas con $r_{\text{Pearson}} < 0.8$ se incluyeron en un mismo modelo multivariado, a partir del cual se seleccionó el modelo más parsimonioso por un proceso manual de step-backward. Los modelos se ajustaron con el paquete *glmmTMB* (Brooks y col., 2017). A fin de trabajar con escalas comparables, las variables numéricas se centraron y estandarizaron. Los resultados del modelo final se reportaron como *Odds-ratio* (OR) y su intervalo de confianza al 95 % (95 % CI). El nivel de significancia estadística se estableció como $P \leq 0.05$.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Para los procedimientos empleados se siguieron las recomendaciones de la American Society of Mammalogists (ASM) para el uso de animales silvestres en investigación (Sikes, 2016). A su vez, el protocolo de trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (Expediente 14 681).

RESULTADOS

COMUNIDAD DE MICROMAMÍFEROS

Se capturó un total de 119 roedores y 2 marsupiales (*Cryptonanus chacoensis*), con un esfuerzo de muestreo de 1661 trampas-noche Sherman y 1556 trampas-noche jaula. Entre los roedores se capturaron seis especies nativas (*Cavia aperea*, *Akodon azarae*, *Scaptomyrmus aquaticus*, *Holochilus chacarius*, *Oligoryzomys flavescens*, *Oligoryzomys nigripes*) y tres introducidas (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus*). El éxito de captura fue mayor en las trampas tipo Sherman (6.1 %) que en las tipo jaula (1.3 %). El peso corporal de los animales influyó sobre el éxito de captura de cada tipo de trampa

($P < 0.001$), con las especies más pequeñas siendo capturadas exclusivamente en trampas tipo Sherman.

La mayor cantidad de capturas correspondió al sitio LZ-C (40.5%), mientras que en el sitio AV-N no se capturaron micromamíferos. Las especies más frecuentemente capturadas fueron *S. aquaticus* (44.6%), *A. azarae* (17.4%) y *O. flavescens* (15.7%). Esta última especie se capturó en los tres tipos de ambiente, a diferencia de los roedores introducidos que no se capturaron en ambientes naturales, y de *A. azarae*, que no se capturó en ambientes centro (Fig. 3.3).

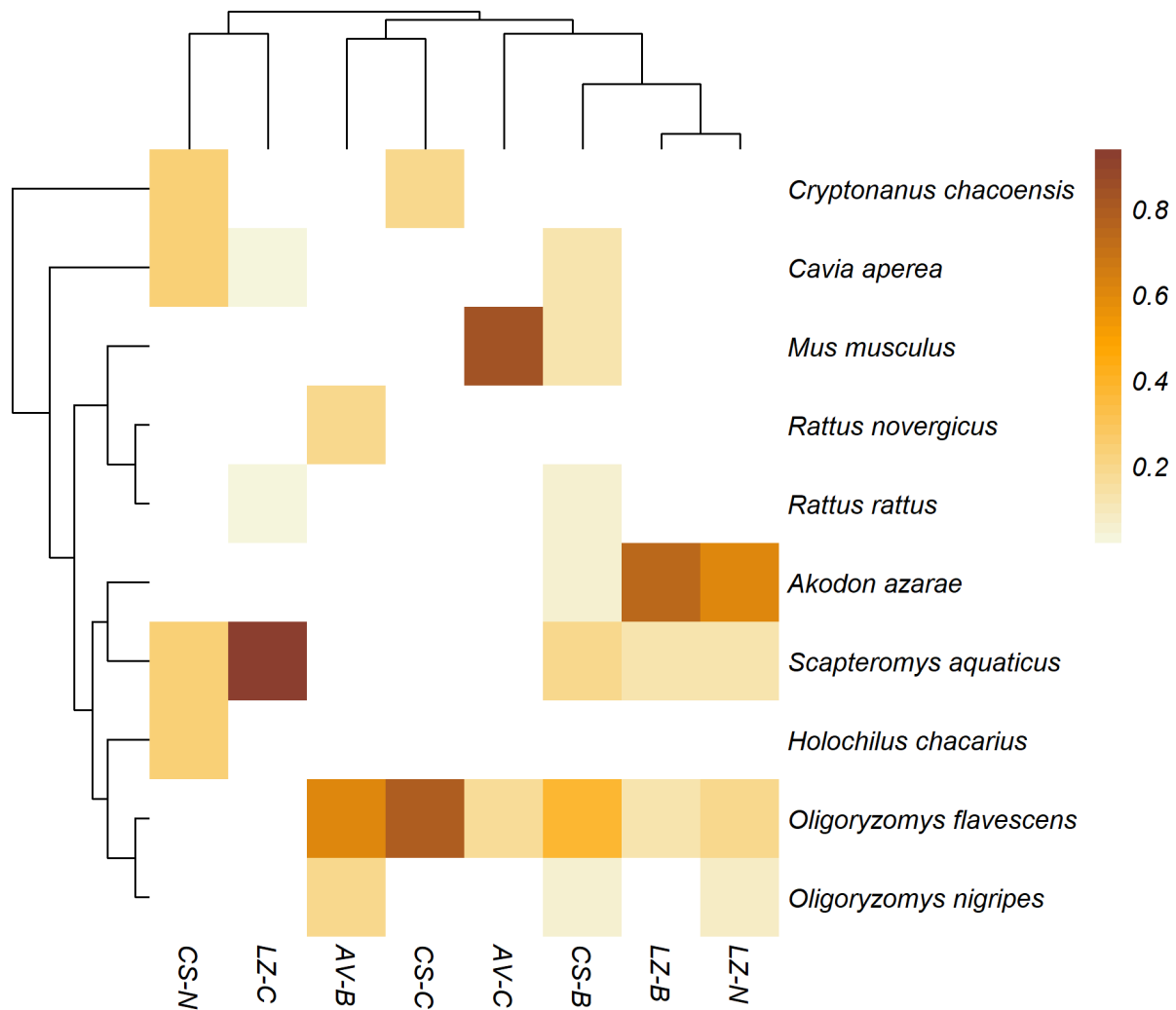


Figura 3.3. Similitudes en la comunidad de micromamíferos entre sitios. El dendrograma superior muestra el agrupamiento de los sitios según índice de Chao. El dendrograma de la izquierda muestra relaciones filogenéticas entre especies. La abundancia relativa (p_i) de micromamíferos se representa como un mapa de calor, donde los tonos más oscuros indican valores más altos.

En el análisis de similitud, se observó poca congruencia entre sitios pertenecientes a

un mismo tipo de ambiente, siendo más similares en cuanto a composición de especies los sitios CS-B, LZ-B y LZ-N (Fig. 3.3). El sitio CS-B presentó la mayor riqueza ($S = 8$) y diversidad ($H' = 1.77$) de micromamíferos, habiéndose capturado 5 especies nativas y 2 especies introducidas (Fig. 3.3). La menor riqueza de especies se observó en los sitios AV-C y CS-B ($S = 2$). El sitio LZ-C estuvo dominado por *S. aquaticus* (Fig. 3.3) y presentó la menor diversidad ($H' = 0.27$).

De los 121 micromamíferos capturados, 61 (50.4%) fueron hembras y 60 (49.6%) machos. Se determinó edad para los 119 roedores, entre los cuales 84.7% de los machos y 68.3% de las hembras presentaban signos de madurez sexual. Se registró condición corporal en 97.5% de los roedores, la mayoría (43.1%) presentaron condición corporal intermedia (BCS = 3), 9.5% condición deteriorada (BCS = 1) y no se observaron animales en la condición más alta (BCS = 5). Un 9.2% de los roedores capturados presentó heridas probablemente producidas por mordeduras.

PREVALENCIA DE LEPTOSPIRAS PATÓGENAS

De 121 animales analizados por real-time PCR, se detectaron leptospiiras patógenas en riñón de un individuo de *S. aquaticus* capturado en el sitio LZ-C. El mismo, era un macho adulto y presentaba mordeduras en las orejas. La muestra positiva tuvo una concentración de 1 leptospira/ μ l de ADN. La especie infectante se identificó por amplificación del gen *16S rRNA* como *Leptospira interrogans*. No se logró obtener un aislamiento bacteriano por cultivo ni tipificación genotípica por los esquemas de MLST. Se analizaron por MAT los sueros del individuo positivo para *LipL32* y los demás *S. aquaticus* capturados en el mismo sitio y muestreo ($n = 18$). Ninguna de las muestras analizadas fue reactiva a la MAT. Una de las muestras analizadas por el control interno *18S* resultó negativa y fue descartada.

Se analizaron por ELISA los sueros de 101 roedores, excluyendo muestras de especies no detectadas por el conjugado de anticuerpos secundarios, de animales muertos en la trampa o en las que no fue posible separar el suero de la sangre entera. La seroprevalencia total fue del 41.6% y no se detectaron anticuerpos contra leptospiiras patógenas en el individuo positivo para *LipL32*. Se observaron diferencias significativas en la seroprevalencia por sitio ($P = 0.005$), siendo seropositivos todos los animales analizados en los sitios CS-C y CS-N y ninguno del sitio AV-C (Tabla 3.1). Los test de asociación no encontraron diferencias significativas en la seroprevalencia entre ambientes, mientras que la seroprevalencia entre especies difirió significativamente (Tabla 3.1). Entre las especies más abundantes, la mayor seroprevalencia correspondió a *O. flavescens* y la menor a *M. musculus* (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Seroprevalencia (%) de leptospiras patógenas en roedores múridos y sigmodontinos (n = 101) de asentamientos marginales ribereños, Santa Fe, Argentina (Sep-Oct 2014; Mar-Abr 2015; Sep-Oct 2015)

Variable	Analizados	Negativos (%)	Positivos (%)	P
Sitio				0.005
AV-B	5 (5.0)	1 (20.0)	4 (80.0)	
AV-C	10 (9.9)	10 (100.0)	0 (0.0)	
CS-B	13 (12.9)	6 (46.2)	7 (53.8)	
CS-C	3 (3.0)	0 (0.0)	3 (100.0)	
CS-N	2 (2.0)	0 (0.0)	2 (100.0)	
LZ-B	14 (13.9)	9 (64.3)	5 (35.7)	
LZ-C	40 (39.6)	25 (62.5)	15 (37.5)	
LZ-N	14 (13.9)	8 (57.1)	6 (42.9)	
Ambiente				0.264
Borde	32 (31.7)	16 (50.0)	16 (50.0)	
Centro	53 (52.5)	35 (66.0)	18 (34.0)	
Natural	16 (15.8)	8 (50.0)	8 (50.0)	
Especie				0.011
<i>Akodon azarae</i>	21 (20.8)	12 (57.1)	9 (42.9)	
<i>Scapteromys aquaticus</i>	46 (45.5)	27 (58.7)	19 (41.3)	
<i>Holochilus chacarius</i>	1 (1.0)	0 (0.0)	1 (100.0)	
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	18 (17.8)	8 (44.4)	10 (55.6)	
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	2 (2.0)	1 (50.0)	1 (50.0)	
<i>Mus musculus</i>	11 (10.9)	11 (100.0)	0 (0.0)	
<i>Rattus novergicus</i>	1 (1.0)	0 (0.0)	1 (100.0)	
<i>Rattus rattus</i>	1 (1.0)	0 (0.0)	1 (100.0)	

AV: Alto Verde; CS: Colastiné Sur; LZ: Los Zapallos

B: borde; C: centro; N: natural

FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA PROBABILIDAD DE INFECCIÓN

Se elaboraron 8 modelos multivariados en base a los resultados del análisis univariado y test de correlación (Tabla 3.2 y Fig. S5). En todos los modelos se incluyó especie, sexo, madurez sexual, condición corporal, presencia de mordeduras, tipo de ambiente y una de las variables climáticas seleccionadas. Ninguno de estos modelos representó una mejora respecto al modelo nulo (Tabla S6). El modelo univariado que incluía a la temperatura máxima promedio desfasada 1 mes, supuso una mejora respecto del modelo nulo ($\Delta AICc = 2.55$). Sin embargo, el efecto de la temperatura sobre la seropositividad fue marginalmente significativo (OR: 0.58, 95% CI: 0.33–1.02) y los efectos aleatorios no explicaron varianza.

Tabla 3.2. Comparación de modelos univariados para evaluar asociación entre variables climáticas y seropositividad en roedores (GLMM binomial, con sitio como efecto aleatorio)

	Modelo	AICc	Δ AICc	K	Wi
Temperatura máxima (promedio), <i>lag 1</i>		121.26	0.00	3	0.17
Temperatura mínima, 90 días		122.25	0.99	3	0.11
Temperatura media (promedio), <i>lag 1</i>		122.53	1.26	3	0.09
Temperatura mínima (promedio), <i>lag 2</i>		123.16	1.90	3	0.07
Temperatura máxima, 90 días		123.46	2.19	3	0.06
Temperatura mínima (promedio), <i>lag 3</i>		123.56	2.29	3	0.05
Temperatura media (promedio), <i>lag 2</i>		123.58	2.32	3	0.05
Precipitación acumulada, 90 días		123.63	2.37	3	0.05
Modelo nulo		123.82	2.55	2	0.05
Temperatura mínima (promedio), <i>lag 1</i>		123.85	2.58	3	0.05
Temperatura media (promedio), <i>lag 3</i>		123.89	2.63	3	0.05
Precipitación mensual, <i>lag 3</i>		124.05	2.78	3	0.04
Temperatura máxima (promedio), <i>lag 2</i>		124.12	2.86	3	0.04
Temperatura máxima (promedio), <i>lag 3</i>		124.21	2.94	3	0.04
Precipitación mensual, <i>lag 1</i>		124.28	3.02	3	0.04
Precipitación acumulada, 90-180 días		125.24	3.98	3	0.02
Precipitación mensual, <i>lag 2</i>		125.66	4.40	3	0.02

AICc: criterio de información de Akaike de segundo orden;

Δ AICc: diferencia entre el AICc del modelo candidato y el mejor modelo;

K: número de parámetros; Wi: pesos de Akaike

lag 1-3: desfase en meses

DISCUSIÓN

Se detectó la presencia de *Leptospira interrogans* en una muestra de tejido renal de *Scapteromys aquaticus*. Se detectaron además anticuerpos contra leptospiras patógenas mediante la técnica ELISA IgG, en 15 individuos de la misma población y en 4 individuos de poblaciones distintas. Este hallazgo resulta relevante ya que hasta el momento de la publicación de resultados parciales (Ricardo y col., 2018b), no existían registros previos de infección para *S. aquaticus*. Esta especie, prefiere ambientes pantanosos y semi-acuáticos con vegetación baja (Bonaventura y col., 2003; Bonvicino y col., 2013). El área de distribución de *S. aquaticus* abarca Paraguay, sur de Brasil, oeste de Uruguay y las ecorregiones del Chaco Húmedo, Delta e Islas del Paraná, Espinal, Esteros del Iberá y Pampeana en Argentina (Barquez y col., 2006; D'Elía y Pardiñas, 2004; Bonvicino y col., 2013). Se ha observado, que la presencia de *L. interrogans* suele estar restringida a ambientes húmedos o inundados (Cosson y col., 2014; Dietrich y col., 2018), y que *S. aquaticus* puede trasladarse en busca de este tipo de ambientes (Bonaventura y col., 2003). Dicha combinación de factores, podría suponer una mayor probabilidad de infección en humanos y animales domésticos residentes en áreas inundables.

El roedor infectado era un macho adulto que presentaba mordeduras en las orejas. Estudios previos sugieren que el comportamiento de los machos y la presencia de heridas incrementan el riesgo de exposición a patógenos (Glass y col., 1988; Himsworth y col., 2013a; Costa y col., 2014). La presencia de leptospiras en el tejido renal indica una potencial capacidad de excretar leptospiras patógenas al ambiente. El hecho de no se hayan detectado anticuerpos contra leptospiras patógenas por MAT o ELISA podría deberse a una infección reciente o una baja respuesta inmune (Aviat y col., 2009; Himsworth y col., 2013b). No se obtuvo un aislamiento de *L. interrogans* a partir del cultivo, esto podría estar relacionado a la baja sensibilidad de la técnica (Vanasco y col., 2001; Agudelo-Flórez y col., 2009; Perez y col., 2011; Houemenou y col., 2013) y que la conservación a -80°C haya reducido la viabilidad de las leptospiras (Sasse y Reuter, 1978; WHO, 2003).

Mediante la técnica de ELISA IgG, se encontraron altas seroprevalencias en *Oligoryzomys flavescens* (55.5%), *S. aquaticus* (41.3%) y *Akodon azarae* (40.9%). Un estudio de 2003 de la ciudad de Santa Fe, registró seroprevalencias del 84% en *O. flavescens* y del 41% en *A. azarae* (Vanasco y col., 2003). Más recientemente se detectaron individuos de estas tres especies infectados en la provincia de Buenos Aires (Lovera y col., 2017; Colombo y col., 2018). Al tratarse de especies que se encuentran tanto en ambientes naturales como poblados, serían un potencial factor de exposición a leptospiras patógenas para humanos y animales. Al igual que en Colombo y col. (2018), no fue posible la tipificación serológica de las leptospiras presentes en *S. aquaticus*, posiblemente por tratarse de un serogrupo no contemplado en el panel del MAT. Las PCR negativas pueden deberse a inhibidores de la PCR, baja concentración de leptospiras en la muestra, o a que no desarrollen infecciones crónicas y sean hospedadores incidentales de serovares propios de otras especies (Vanasco y col., 2003; Agudelo-Flórez y col., 2009; Villanueva y col., 2010; Houemenou y col., 2013; Dietrich y col., 2018).

Ninguno de los *Mus musculus* capturados fue seropositivo, lo cual contrasta con los resultados de Vanasco y col. (2003) y de otros estudios que encontraron altas prevalencias en esta especie (Muñoz-Zanzi y col., 2014b; Lovera y col., 2017). Todos ejemplares capturados pertenecían al área peridomiciliaria de los sitios AV-C y CS-B. Existen reportes de que, exceptuando grandes centros urbanos, la prevalencia es menor en zonas pobladas (Ivanova y col., 2012; Cosson y col., 2014; Muñoz-Zanzi y col., 2014b) y varía entre distintas áreas de una misma ciudad (Himsworth y col., 2013a).

No se encontraron asociaciones estadísticas significativas entre la seropositividad y los factores analizados a nivel de individuo, coincidiendo con lo reportado en Tucunduva de Faria y col. (2008), Agudelo-Flórez y col. (2009), Aviat y col. (2009) y Rothenburger

y col. (2017). Estudios similares encontraron asociación entre seropositividad y especie, edad o sexo (Vanasco y col., 2003; Easterbrook y col., 2007; Katakweba y col., 2012). Por otro lado, estudios de prevalencia de leptospiras patógenas en tejido renal, encontraron asociaciones con sexo, edad, condición corporal, presencia de heridas, especie o tipo de ambiente (Perez y col., 2011; Ivanova y col., 2012; Himsforth y col., 2013a; Costa y col., 2014; Cosson y col., 2014; Costa y col., 2015b). La ausencia de asociación entre seropositividad y condiciones ambientales, podría deberse a que los anticuerpos se mantienen en circulación aún después de que la infección fuera eliminada (Vanasco y col., 2003; Easterbrook y col., 2007). Es probable que los ambientes seleccionados no fueran lo suficientemente diferentes entre sí como para observar cambios en la comunidad de roedores, y por ello no se hayan observado diferencias en la seroprevalencia entre hábitats (Dietrich y col., 2018). Debe considerarse además, que en ambientes antropizados los animales pueden tener en contacto entre sí durante todo el año, y que el efecto del clima sobre la supervivencia y transmisión del patógeno suele verse atenuado (Rothenburger y col., 2017; Millán y col., 2018).

Este estudio contó con varias limitaciones a ser consideradas. Por un lado, solo se realizaron tres muestreos de micromamíferos correspondientes a los dos años de duración del proyecto, no pudiendo realizarse un cuarto muestreo por anegamiento de los sitios de estudio. Además, dado que los muestreos se realizaron en dos primaveras y un otoño, no fue posible evaluar el efecto de la estación. Por otro lado se obtuvo un bajo éxito de captura, y por tratarse de ambientes antropizados gran cantidad de trampas fueron vandalizadas o perdidas. El número de capturas obtenido en estos ambientes no permitió utilizar modelos más complejos, incorporando interacciones entre variables climáticas o entre características del animal, así como tampoco distinguir variación causada por efectos aleatorios. Otra limitación fue la baja detección obtenida mediante la técnica de real-time PCR, posiblemente vinculada a la presencia de inhibidores o a bajas concentraciones de leptospiras en tejido renal. La técnica de ELISA utilizada no permite la detección de anticuerpos en roedores cávidos ni marsupiales, adicionalmente debieron descartarse muestras con suero de mala calidad. Además, si bien se registraron altas seroprevalencias por ELISA, la escasa cantidad de suero obtenida en roedores silvestres no permitió realizar el MAT para tipificación serológica o el resultado del mismo fue negativo.

De todos modos, se considera que este estudio contribuye a avanzar en el conocimiento de la ecoepidemiología de leptospirosis en Argentina. Entre las razones se cuenta el haber encontrado leptospiras patógenas en riñón *S. aquaticus*, anticuerpos contra las mismas en distintas especies de roedores silvestres de la provincia de Santa Fe mediante la técnica de ELISA IgG. Estos resultados no permiten determinar si se trata de especies reservorio o infecciones incidentales. A fin de esclarecer el rol de los roedores silvestres en la dispersión

de leptospirosis en el ambiente, es importante continuar las investigaciones en la zona, teniendo en cuenta que las condiciones ambientales de la misma son propicias para la proliferación de leptospirosis.

CAPÍTULO 4

EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE LEPTOSPIRAS EN FUENTES DE AGUA AMBIENTAL

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial causada por espiroquetas del género *Leptospira*. Las leptospiras patógenas se excretan con la orina de mamíferos hospedadores, persistiendo durante semanas o meses en el ambiente (WHO, 2003; Trueba y col., 2004; Céspedes, 2005; Haake y Levett, 2015). El ser humano es un hospedador incidental y puede adquirir la infección por contacto directo con orina y tejidos de animales infectados, o indirectamente a través de agua y suelo contaminados (WHO, 2003; Ko y col., 2009; Haake y Levett, 2015).

El género *Leptospira*, cuenta con formas saprófitas de vida acuática, y formas patógenas que pueden sobrevivir en el agua (Ko y col., 2009). Las bacterias planctónicas, suelen incrementar su resistencia agregándose en biofilms, que se adhieren a superficies bióticas o abióticas (Ristow y col., 2008). Tanto las leptospiras saprófitas como las patógenas son capaces de formar biofilms, ya sea entre si mismas o con otras bacterias del ambiente (Trueba y col., 2004; Ristow y col., 2008; Vinod Kumar y col., 2015, 2016). Esta capacidad, probablemente influye sobre la supervivencia de las leptospiras patógenas en distintos ambientes y en la transmisión de la enfermedad (Vinod Kumar y col., 2015, 2016; Fung Pui y col., 2017). La persistencia en el ambiente, también se ve favorecida por un pH entre 5.5-7.6, temperaturas entre 4-40°C y por una mayor turbidez y/o viscosidad del medio (Gordon Smith y Turner, 1961; Khairani-Bejo y col., 2004; Trueba y col., 2004; Viau y Boehm, 2011; Saito y col., 2013a; Andre-Fontaine y col., 2015). Estas dos últimas condiciones, influyen sobre la movilidad de las leptospiras y su capacidad para formar biofilms (Trueba y col., 2004; Viau y Boehm, 2011; Takabe y col., 2013). Otros factores que afectan la persistencia en el ambiente son el volumen de orina excretada por los reservorios, la dilución de la misma en el medio, el tipo de fuente, características geográficas y variaciones estacionales (Bharti y col., 2003; Barragan y col., 2017b; Casanovas-Massana y col., 2018).

En Argentina, el principal factor de riesgo de leptospirosis es el contacto persistente con ambientes inundados (Vanasco y col., 2000; Vanasco y col., 2008; CCLA - AAVLD, 2002; MSAL, 2012b, 2014). En los ambientes urbanos, el agua de lluvia o inundación puede hacer colapsar los sistemas cloacales, filtrando agua contaminada hacia los suelos y creando un ambiente propicio para la persistencia de leptospiras patógenas (Céspedes, 2005; Lau y col., 2010; Barragan y col., 2017b). La provincia de Santa Fe es endémica para leptospirosis y presenta brotes epidémicos durante períodos de lluvias intensas o eventos de inundación (Vanasco y col., 2000; Vanasco y col., 2002; Vanasco y col., 2008; CCLA - AAVLD, 2002; Musacchio y col., 2010; MSAL, 2012b, 2014; Cudós y col., 2013). A pesar de esto, existen escasos estudios que evalúen la presencia de leptospiras en muestras ambientales en Argentina (CCLA - AAVLD, 2002; Gatti y col., 2004; Brihuega y col., 2006;

Francois Barbagelata y col., 2013; Scialfa y col., 2017). Los objetivos de este trabajo fueron la detección de leptospiras en muestras de agua ambiental provenientes de asentamientos ribereños de la provincia de Santa Fe, e identificar factores bióticos y abióticos que influyan sobre la presencia de leptospiras.

MATERIALES Y MÉTODOS

SITIOS DE ESTUDIO

La ciudad de Santa Fe ($31^{\circ}38'0''S$, $60^{\circ}42'0''O$), capital de la provincia de Santa Fe, está situada en el noreste de Argentina, en la unión de los ríos Paraná y Salado y cuenta con una población 391 231 habitantes según el Censo 2010 (IPEC - INDEC). Los sitios de estudio comprendieron tres barrios ribereños de Santa Fe (AV: Alto Verde, CS: Colastiné Sur, VP: La Vuelta del Paraguay) y un asentamiento a 30 km NE de la ciudad (LZ: Los Zapallos, Fig. 4.1). Los sitios se ubican en el valle de inundación del río Paraná, un área vulnerable a inundaciones y con diferentes niveles de deficiencia en infraestructura sanitaria. Ninguno de los sitios posee calles pavimentadas o servicio de cloacas y la recolección de residuos es irregular. Además, en el sitio CS no se cuenta con servicio de agua de red.

RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Se recolectaron 90 muestras de agua procedentes de distintas fuentes ambientales. De las mismas, 30 se recolectaron durante octubre de 2014 en los sitios AV, CS y LZ, al finalizar el primer muestreo de micromamíferos (Capítulo 3). Las 60 muestras restantes se recolectaron en mayo de 2016, en zonas afectadas por la inundación del Río Paraná de los sitios VP, CS y LZ, el muestreo se realizó en paralelo a las encuestas de conocimientos, actitudes y prácticas (CAP, Capítulo 2). En el primer muestreo se tomaron 10 muestras de agua por sitio, mientras que en el segundo muestreo se tomaron 20 muestras de agua por sitio.

Las muestras se recolectaron en tubos Falcon estériles de 50 ml y se transportaron a temperatura ambiente y aisladas de la luz solar en conservadora plástica. Se registró tipo de ambiente (Fig. 4.2) y se determinaron pH y turbidez de la muestra. A las muestras recolectadas en 2016 se les registró además, presencia de basura, perros y ganado en los alrededores (5 m) del cuerpo de agua. Las muestras se almacenaron a $4^{\circ}C$ y se procesaron dentro de las 48 hs.

Los tubos se centrifugaron a máxima velocidad (8000 rpm) durante 15 min a $4^{\circ}C$, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los pellets en 1 ml de buffer fosfato sa-

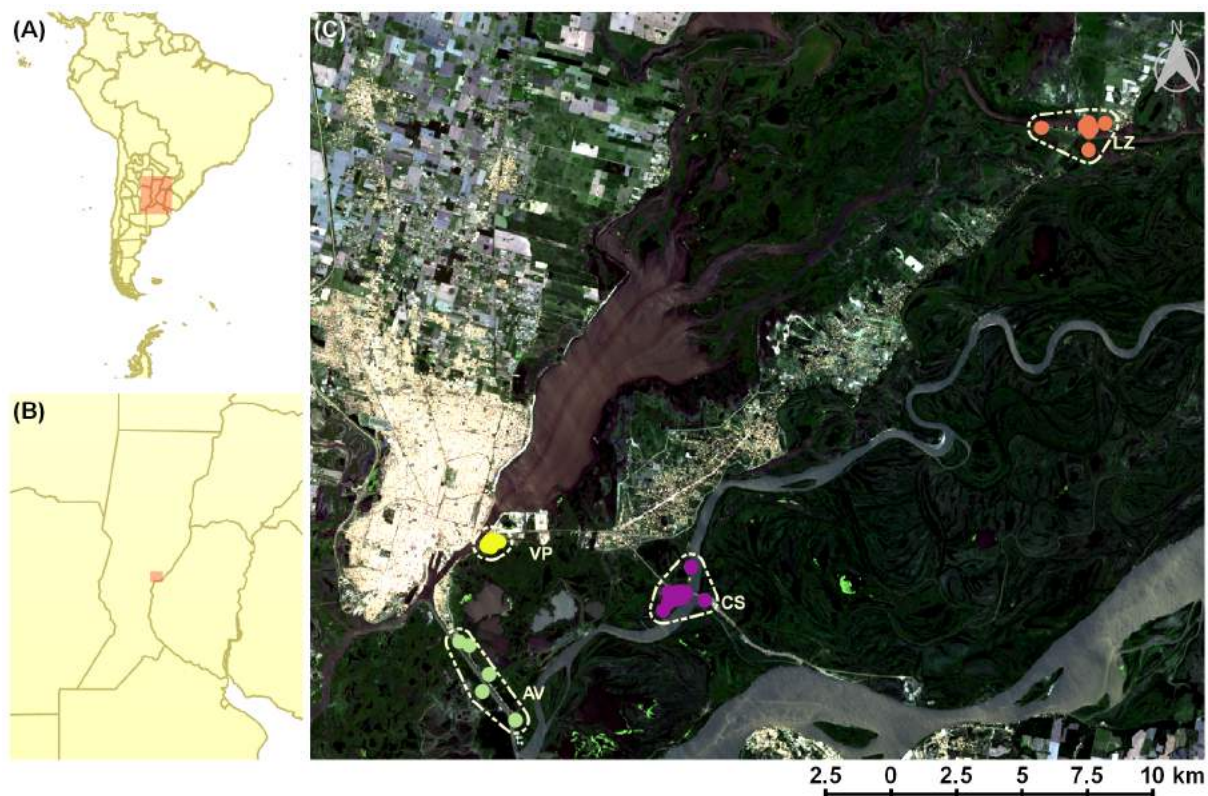


Figura 4.1. Sitios de estudio. (A) Ubicación de la provincia de Santa Fe en Argentina; (B) Ubicación del área de estudio en la provincia de Santa Fe; (C) Localización de los sitios donde se realizó el muestreo de fuentes de agua ambiental, los puntos de colores indican las zonas en las que se recolectaron muestras. Mapa generado en QGIS Geographic Information System. Imágenes satelitales LANDSAT8 OLI/TIRS descargadas de [U.S. Geological Survey](#). Capas vectoriales descargadas de [Natural Earth](#).

lino (PBS) estéril. Los pellets resuspendidos se traspasaron a tubos Eppendorf estériles de 1.5 ml y se centrifugaron a máxima velocidad (13 500 xg) durante 15 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los pellets en 1 ml de PBS estéril. Los pellets resuspendidos se almacenaron en freezer a -20°C.

CULTIVO

Las muestras colectadas en octubre de 2014 se enviaron al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Dr. Emilio Coni” (INER) para la realización de cultivo. El pellet resuspendido se sembró en 8 ml de medio Ellinghausen-Mc-Cullough-Johnson-Harris (EMJH) semisólido. A los cultivos originales se les realizó un repique en otro medio EMJH semisólido para aumentar la sensibilidad de la técnica y disminuir las contaminaciones. Los cultivos se incubaron a 28°C y se observaron en microscopio de campo oscuro la primer semana y luego mensualmente durante 4 meses (WHO, 2003; Chiani y col., 2016).



Figura 4.2. Tipos de ambiente muestreados, Santa Fe, Argentina (2014-2016). (A) Orilla de río; (B) Laguna temporal; (C) Charco de agua estancada; (D) Bañado; (E) Alcantarilla a cielo abierto (“zanja”); (F) Recipiente con agua estancada. Fotos: Lic. Tamara Ricardo.

REAL-TIME PCR

A las muestras recolectadas en mayo de 2016, se les extrajo ADN genómico con Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, USA), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante y utilizando 1 ml de pellet resuspendido por muestra. La pureza y concentración del ADN obtenido se midió utilizando un espectrofotómetro SPECTROStar[®] Nano con MARS Data Analysis Software (BMG Labtech, Germany), considerándose aceptables aquellas muestras con una pureza de entre 1.8 y 2 de coeficiente de absorbancia 260/280 y concentración de ADN mayor o igual a 100 ng/ μ l.

Se utilizó el procedimiento de real-time PCR descrito en Stoddard y col. (2009) y modificado por Bourhy y col. (2011), utilizando un termociclador StepOne[®] (Applied Biosystems). El mismo, amplifica un segmento de 242 pb del gen *LipL32* y puede detectar leptosiras patógenas de las genomoespecies *L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai* y *L. weilii* (Stoddard y col., 2009). El ADN de *Leptospira* se cuantificó mediante comparación de curvas de calibrado hechas a partir de diluciones seriadas entre 10^5 y 1 bacteria/ μ l de control positivo, en ensayos independientes.

Las real-time PCR se llevaron a cabo en un termociclador StepOne[®] (Applied Biosystems) con un volumen final de 20 μ l por reacción conteniendo 4 μ l de buffer Phire 5x, 200 μ M dNTP, 0,4 pM de cada primer, 2 μ l de 10x SYBR Green I (Invitrogen, USA), 150 ng de ADN y 0,4 μ l de enzima Phire[®] Hot Start II (ThermoFisher, USA). Las reacciones consistieron de una desnaturalización inicial de 3 min a 98°C, seguida de 40 ciclos de 5 seg a 98°C, 15 seg a 53°C y una extensión de 20 seg a 72°C e incluyeron un control positivo (150 ng de ADN de *Leptospira interrogans* serovar Canicola cepa Hond Utrecht IV, a concentración de 10^8 bacterias/ml). Se incluyó un control negativo consistente en agua ultrapura. Todos los tubos de reacción se prepararon en cabinas de bioseguridad, utilizando material estéril y tips con filtro descartables. El chequeo de amplicones mediante geles de agarosa se realizó en otra sala con material descartable y equipamiento exclusivo para tal fin. Las muestras que amplificaron para *LipL32* antes del ciclo 40 se volvieron a analizar por triplicado para descartar falsos positivos.

IDENTIFICACIÓN DE LEPTOSPIRAS

Para determinar la especie de *Leptospira* en las muestras positivas para cultivo o real-time PCR, se amplificó un segmento de 331 pb del gen *16S rRNA* (Merien y col., 1992) mediante PCR convencional, siguiendo el protocolo descrito en Chiani y col. (2016). El primer paso de la PCR consistió en una desnaturalización de 3 min a 94°C, annealing de 90 seg a 63°C y extensión por 2 min a 72°C, seguido de 29 ciclos de 1 min a 94°C, 90 seg a

63°C y 2 min a 72°C . El último paso fue una extensión por 10 min a 72°C. Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa al 2 %.

Los productos de secuenciación de PCR *16S rRNA* se purificaron con GeneJET® PCR Purification Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) y fueron secuenciados por Macrogen Inc (Seoul, Korea). Las secuencias se editaron, ensamblaron, alinearon y analizaron de acuerdo a lo descrito en Chiani y col. (2016).

ANÁLISIS DE DATOS

Los datos se ingresaron mediante LibreOffice Calc y se analizaron con R software versión 3.4.3 (R Development Core Team, 2017). Se calcularon frecuencia (%), media (SD) y mediana (IQR), para las características físico-químicas (pH, turbidez) de las muestras y presencia de potenciales factores de riesgo en las inmediaciones. Se utilizaron análisis de la varianza (ANOVA) con test de comparación múltiple de Tukey, o ANOVA Kruskal-Wallis con test de Dunn, para evaluar si existían diferencias significativas entre el pH y la turbidez en los distintos tipos de muestra (Hazra y Gogtay, 2016a). El nivel de significancia estadística se estableció como $P \leq 0.05$.

RESULTADOS

Se recolectó un total de 90 muestras de agua, de las cuales la mayoría (56.7 %) provino de charcos temporales (Fig. 4.3). El pH de las muestras colectadas en 2014 tuvo una mediana de 6.26 (IQR: 6.15-6.34), mientras que en las muestras de 2016 tuvo una mediana de 6.96 (IQR: 6.61-7.40). La turbidez tuvo una mediana de 128 NTU (IQR: 80.2-264) para las muestras de 2014 y de 69.0 (IQR: 31.9-318) para las de 2016. El test ANOVA Kruskal-Wallis encontró diferencias significativas respecto al pH entre los dos años ($P < 0.001$), pero no así para la turbidez ($P = 0.070$). Las muestras de 2014 no presentaron diferencias significativas en el pH ($P = 0.624$) o la turbidez ($P = 0.205$) respecto al tipo de fuente ambiental. Las muestras de 2016, mostraron diferencias significativas en el pH, siendo mayor en charcos con respecto a ríos y lagunas, así como en zanjas respecto a ríos (Tabla 4.1). La turbidez también difirió significativamente entre tipos de fuente, siendo mayor en charcos respecto a ríos y lagunas (Tabla 4.1).

Entre las muestras de 2016, 81.7 % de las fuentes de agua presentaban basura en las inmediaciones, 75 % presencia de perros y 15 % presencia de ganado. No se observaron diferencias significativas en la presencia de basura ($P = 0.77$) y de ganado ($P = 0.06$) entre sitios. La presencia de perros difirió significativamente entre sitios ($P < 0.001$), siendo menor en el sitio VP (40 %) con respecto CS (95 %) y LZ (90 %).

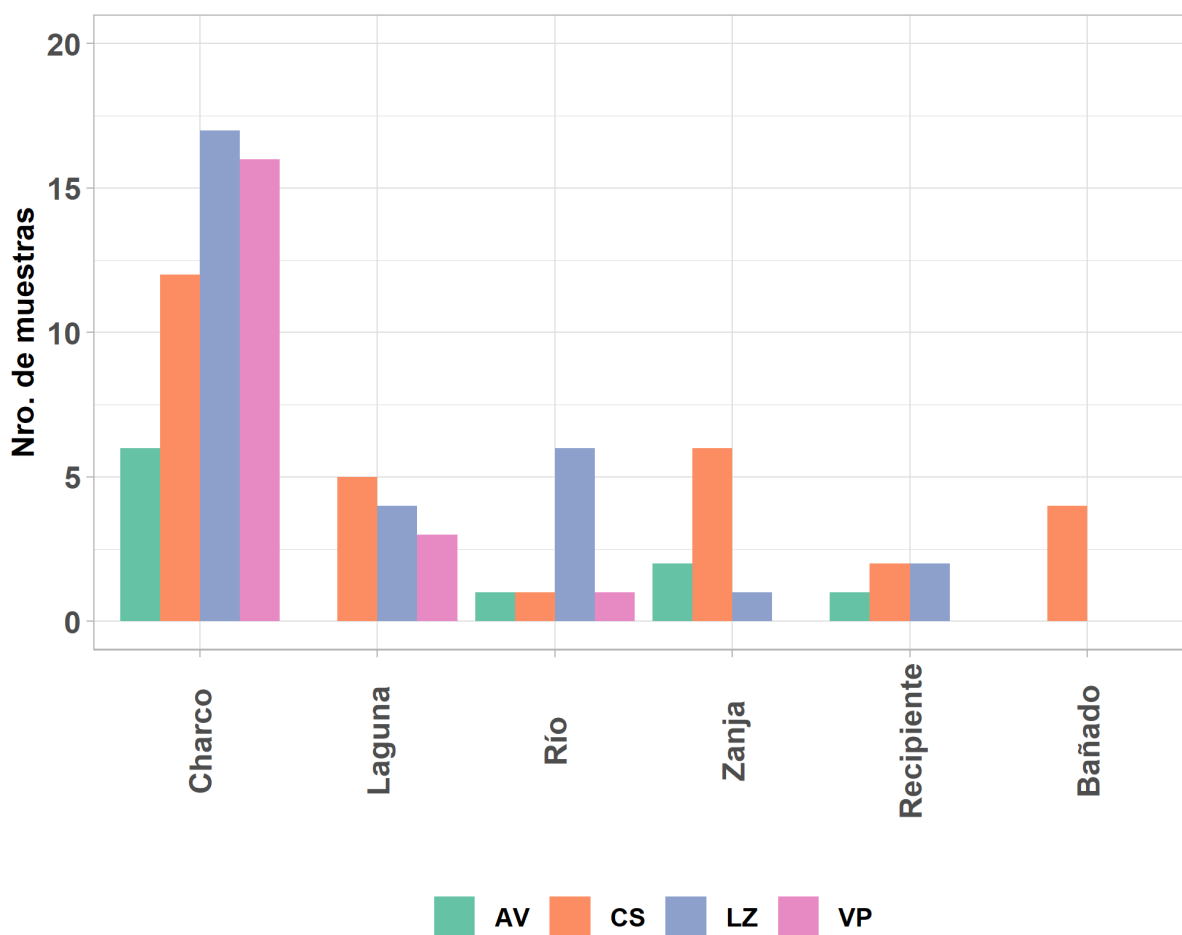


Figura 4.3. Frecuencia de muestras de agua ambiental según tipo de ambiente, Santa Fe, Argentina (Oct. 2014/Mayo 2016). AV: Alto Verde; VP: La Vuelta del Paraguay; CS: Colastiné Sur; LZ: Los Zapallos.

Tabla 4.1. Características físico-químicas de las muestras de agua según tipo de fuente, Santa Fe, Argentina (Mayo 2016)

	Charco N=36	Laguna N=12	Río N=8	Zanja N=4	p.overall
pH	7.22 (0.54)	6.73 (0.41)	6.47 (0.37)	7.37 (0.67)	<0.001
turbidez	158 [49.5;461]	32.8 [26.4;55.8]	29.4 [15.5;63.5]	87.5 [48.9;192]	0.005

Se obtuvo un aislamiento de *Leptospira* a partir de una de las 30 muestras analizadas por cultivo en octubre de 2014. La misma provino de un charco cercano a la zona de viviendas del sitio LZ y tuvo un pH de 6.34 y una turbidez de 103.45. Se amplificó el gen *16S rRNA*, identificándose a la especie presente como *Leptospira meyeri*. No se obtuvo amplificación en ninguna de las muestras analizadas por real-time PCR del gen *LipL32*.

DISCUSIÓN

Se obtuvo un aislamiento de *Leptospira meyeri*, a partir de agua de un charco cercano a la zona de viviendas del sitio Los Zapallos, colectada durante la época de lluvias de 2014. Las comunidades estudiadas, poseen calles de tierra y alcantarillas a cielo abierto (“zanjas”), que la mayor parte del tiempo contienen agua estancada. En períodos de lluvias intensas o inundaciones, se forman charcos en las calles de tierra donde se mezcla este agua con el de las zanjas, incrementándose el riesgo de infección (Sarkar y col., 2002; Reis y col., 2008; Barragan y col., 2017b; Casanovas-Massana y col., 2018; Schneider y col., 2018). De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio de CAP, la mayoría (77%) de los residentes encuestados debía atravesar charcos luego de una lluvia intensa, además, un 60.2% reportó mojarse los pies al atravesar estos charcos (Ricardo y col., 2018a). Los residentes de estas comunidades, suelen dedicarse a la caza y pesca de subsistencia y mantener animales de granja en las inmediaciones del domicilio. Esto, sumado a las deficiencias en el servicio de recolección de residuos fomenta la aparición de microbasurales, atrayendo a roedores, caballos y perros callejeros potencialmente infectados (Maciel y col., 2008; Reis y col., 2008; de Paula Dreer y col., 2013). La especie identificada por secuenciación del gen *16S rRNA*, *Leptospira meyeri*, pertenece al grupo filogenético de las leptospiras saprófitas (Yasuda y col., 1987). Sin embargo, presenta algunos serovares patógenos (Postic y col., 2000; Fearnley y col., 2008; Victoria y col., 2008), habiéndose detectado en el suero de dos pacientes fallecidos de leptospirosis de la provincia de Santa Fe (Chiani y col., 2016).

No se pudieron detectar leptospiras patógenas en ninguna de las muestras de agua analizadas por real-time PCR. Esta baja prevalencia es comparable a la obtenida por Wójcik-Fatla y col. (2014) en Polonia, quienes solamente detectaron ADN de *Leptospira* en 1.9% de las muestras de agua analizadas (n = 104) y con los resultados de Thibeaux y col. (2017) en Nueva Caledonia, quienes no lograron detectar ADN de leptospiras patógenas en muestras de agua. Estudios realizados en fuentes ambientales de Brasil (Vital-Brazil y col., 2010), Colombia (Romero-Vivas y col., 2012; Calderón y col., 2014), Francia (Aviat y col., 2009; Vein y col., 2012), India (Lall y col., 2016), Malasia (Ridzlan y col., 2010; Benacer y col., 2013; Ismail y col., 2014) y Perú (Ganoza y col., 2006) detectaron ADN de leptospiras patógenas en 1-8% de las muestras, aún cuando hubieran detectado ADN de *Leptospira* en un alto porcentaje de muestras (Ganoza y col., 2006; Aviat y col., 2009; Benacer y col., 2013; Lall y col., 2016). Los resultados obtenidos estarían en sintonía con estos autores por el hecho de que también se hallaron leptospiras en tan solo una muestra. Sin embargo, esto también podría deberse a que la leptospiras pueden formar biofilms y adherirse a distintas superficies, dificultando que sean detectadas libres en el agua (Barragan y col., 2017b; Casanovas-Massana y col., 2018).

El estudio tuvo limitaciones. Los cultivos suelen contaminarse con facilidad y tienen baja sensibilidad (WHO, 2003). Las real-time PCR para muestras ambientales pueden dar lugar a falsos negativos, ya sea por presencia de inhibidores o concentraciones por debajo del límite de detección (Wynwood y col., 2014; Schneider y col., 2018). Por otro lado, no se recolectaron muestras de suelo, donde las prevalencias pueden ser mayores (Saito y col., 2014; Thibeaux y col., 2017; Schneider y col., 2018).

A pesar de las limitaciones descritas, el estudio brindó el primer aislamiento de leptospiras a partir de una muestra ambiental en la región centro de la provincia de Santa Fe. Por lo tanto, resultaría necesario continuar optimizando las técnicas de detección y realizar nuevos muestreos en distintas estaciones del año, incluyendo muestras de agua y suelo a fin de entender mejor la circulación de leptospiras en los ambientes estudiados.

CONCLUSIONES GENERALES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis doctoral se puede llegar a las siguientes conclusiones:

- La dinámica temporal de los casos de leptospirosis de la provincia de Santa Fe muestra estacionalidad, aumentando entre fines del verano y principios del otoño. A su vez, se evidenció una relación positiva entre el número de casos de leptospirosis y las precipitaciones.
- Durante el período estudiado, los departamentos La Capital y Rosario presentaron 98 y 77 casos de leptospirosis respectivamente, lo cual equivale a un 52.5 % de los casos reportados para la provincia. Sin embargo, las mayores tasas de incidencia y riesgo relativo correspondieron a los departamentos situados en la costa de los ríos Paraná y Salado.
- Coincidiendo con otras investigaciones realizadas alrededor del mundo, tanto en el análisis de vigilancia epidemiológica como en la encuesta de CAP, se detectó mayor riesgo de leptospirosis en hombres que en mujeres.
- En las comunidades encuestadas, encontramos que si bien la gran mayoría había oído hablar sobre leptospirosis, solo una minoría contaba con información fundamental para prevenir esta enfermedad. Un 74.5 % de los encuestados desconocía que la leptospirosis puede transmitirse por contacto con agua estancada, siendo este uno de los principales factores de riesgo de infección en la región. A su vez, sólo un bajo porcentaje identificó a perros y ganado como animales hospedadores, teniendo estos tanta importancia en la dinámica de la enfermedad como los roedores.
- El conocimiento sobre la enfermedad fue menor en los asentamientos más alejados de la ciudad de Santa Fe, especialmente en la localidad de Los Zapallos del departamento Garay. De acuerdo al análisis espacial, este departamento es uno de los que presenta mayor riesgo relativo de leptospirosis.
- Se detectaron leptospiras patógenas en un individuo de *Scapteromys aquaticus* mediante real-time PCR, y anticuerpos IgG contra las mismas en 19 individuos (41.3 %) de esta especie. Este roedor habita ambientes bajos e inundables y fue dominante en el sitio Los Zapallos, representando un potencial factor de riesgo de infección. Además, el hecho de que se haya detectado *Leptospira interrogans* en tejido renal

de *S. aquaticus*, representaría un factor de riesgo adicional puesto que en diversos estudios se observó mayor persistencia ambiental en *L. interrogans* que en otras leptospiras patógenas.

- También se detectaron anticuerpos IgG contra leptospiras patógenas en los roedores nativos *Akodon azarae*, *Holochilus chacarius*, *Oligoryzomys flavescens* y *O. nigripes*. Sin embargo, al no haber podido detectarlas en tejido renal, no es posible establecer el rol de estos roedores en la circulación ambiental de leptospiras.
- En una muestra de agua de las diez colectadas en octubre de 2014 en Los Zapallos se encontró *Leptospira meyeri*.

Estos hallazgos aportan al conocimiento de la epidemiología de la leptospirosis en Santa Fe y sirven como base para futuros estudios. Además, permiten establecer zonas y factores de riesgo de infección, de utilidad para el desarrollo de políticas de prevención. Las mismas deberían abordarse desde un enfoque “Una Salud”, involucrando a equipos interdisciplinarios e intersectoriales, incorporando médicos, veterinarios, investigadores, pobladores y tomadores de decisiones. De los resultados de esta tesis se identifican como acciones importantes el incrementar el conocimiento sobre síntomas, factores de riesgo, hospedadores y medidas preventivas. Sería óptimo que estas campañas de salud pública llegaran tanto al personal médico como a la población general. Además, también se podría promocionar la vacunación de animales domésticos, que pueden infectarse y transmitir la leptospirosis al ser humano. Se considera además, que un mayor desarrollo de técnicas de diagnóstico sensibles y económicas facilitarían una detección rápida y a campo de la enfermedad en humanos y animales. Para desarrollar nuevas acciones de prevención y evaluar su eficacia, es necesario sostener investigaciones a largo plazo, involucrando ambientes urbanos, periurbanos y rurales de toda la provincia, contemplando aspectos de la salud humana, animal y ambiental.

BIBLIOGRAFÍA

- Abela-Ridder B, Sikkema R y Hartskeerl RA. 2010. «Estimating the burden of human leptospirosis». *Int J Antimicrob Ag* 36S: S5-S7.
- Abiayi EA, Inabo HI, Jatau ED, Makinde AA, Sar TT, Ugbe DA, Kumbish PR y Okewole PA. 2015. «Knowledge, Attitudes, Risk Factors and Practices (KARP) that Favor *Leptospira* Infection among Abattoir Workers in North Central Nigeria». *Asian J Epidemiol* 8 (4): 104-13.
- Acha PN y Szyfres B. 2001. «Leptospirosis». En *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales*, 3.^a ed., 176-86. Washington, DC, EUA: Organización Panamericana de la Salud.
- Adler B. 2015. «History of leptospirosis and *Leptospira*». En *Leptospira and Leptospirosis*, ed. por Adler B, 1-9. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 387. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Adler B y de la Peña Moctezuma A. 2010. «*Leptospira* and leptospirosis». *Vet Microbiol* 140: 287-96.
- Agampodi SB, Agampodi TC, Thalagala E, Perera S, Chandraratne S y Fernando S. 2010. «Do People Know Adequately about Leptospirosis? A Knowledge Assessment Survey in Post-outbreak Situation in Sri Lanka». *Int J Prev Med* 1 (3): 158-63.
- Agampodi SB, Dahanayaka NJ, Bandaranayaka AK, Perera M, Priyankara S, Weerawansa P, Matthias MA y Vinetz JM. 2014. «Regional Differences of Leptospirosis in Sri Lanka: Observations from a Flood-Associated Outbreak in 2011». *PLoS Negl Trop Dis* 8 (1): e2626.
- Agresti A. 2015. «Models for Count Data». En *Foundations of Linear and Generalized Linear Models*, 228-60. Wiley Series in Probability and Statistics. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Agudelo-Flórez P, Londoño Af, Quiroz VH, Ángel JC, Moreno N, Loaiza ET, Muñoz LF y Rodas JD. 2009. «Prevalence of *Leptospira* spp. in urban rodents from a Groceries Trade Center of Medellín, Colombia». *Am J Trop Med Hyg* 81 (5): 906-10.

- Ahmed N, Manjulata Devi S, Valverde MA, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA y Hartskeerl RA. 2006. «Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species». *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 5 (28). doi:[10.1186/1476-0711-5-28](https://doi.org/10.1186/1476-0711-5-28).
- Andre-Fontaine G, Aviat F y Thorin C. 2015. «Waterborne Leptospirosis: Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic *Leptospira* spp. in Fresh Water». *Curr Microbiol* 71 (1): 136-42.
- Arango J, Cittadino E, Agostini A, Mazzonelli GD de, Alvarez C, Colusi M, Koval A, Cabrera Britos A y Kravetz F. 2001. «Prevalencia de leptospirosis en *Rattus rattus* y *Rattus norvegicus* en el Gran Buenos Aires, Argentina». *Ecol Austral* 11: 25-30.
- Arbiol J, Orencio PM, Romena N, Nomura H, Takahashi Y y Yabe M. 2016. «Knowledge, Attitude and Practices towards Leptospirosis among Lakeshore Communities of Calamba and Los Baños, Laguna, Philippines». *Agriculture* 6 (18). doi:[10.3390/agriculture6020018](https://doi.org/10.3390/agriculture6020018).
- Aviat F, Blanchard B, Michel V, Blanchet B, Branger C, Hars J, Mansotte F, Brasme L, De Champs C, Bolut P, Mondot P, Faliu J, Rochereau S, Kodjo A y Andre-Fontaine G. 2009. «*Leptospira* exposure in the human environment in France: A survey in feral rodents and in fresh water». *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 32 (6): 463-76.
- Bacallao J, Schneider MC, Najera P, Aldighieri S, Soto A, Marquiño W, Sáenz C, Jiménez E, Moreno G, Chávez O, Galan DI y Espinal MA. 2014. «Socioeconomic Factors and Vulnerability to Outbreaks of Leptospirosis in Nicaragua». *Int J Environ Res Public Health* 11: 8301-18.
- Bakka H, Rue H, Fuglstad GA, Riebler A, Bolin D, Illian J, Krainski E, Simpson D y Lindgren F. 2018. «Spatial modeling with R-INLA: A review». *WIREs Comp Stat* 10 (6): e1443.
- Ballados-González GG, Sánchez-Montes S, Romero-Salas D, Colunga Salas P, Gutiérrez-Molina R, León-Paniagua L, Becker I, Méndez-Ojeda ML, Barrientos-Salcedo C, Serna-Lagunes R y Cruz-Romero A. 2018. «Detection of pathogenic *Leptospira* species associated with phyllostomid bats (Mammalia: Chiroptera) from Veracruz, Mexico». *Transbound Emerg Dis* 65 (3): 773-81.
- Barcellos C y Sabroza PC. 2001. «The place behind the case: leptospirosis risks and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro». *Cad Saúde Pública* 17 (suppl): S59-S67.

- Bardosh K. 2014. «Global aspirations, local realities: The role of social science research in controlling neglected tropical diseases». *Infect Dis Poverty* 3 (35). doi:[10.1186/2049-9957-3-35](https://doi.org/10.1186/2049-9957-3-35).
- Barkat A, Helali J, Rahman M, Majid M y Bose M. 1995. *Knowledge attitude perception and practices relevant to the utilization of emergency obstetric care services in Bangladesh: a formative study*. Dhaka Bangladesh University Research Corporation.
- Barquez RM, Diaz M y Ojeda RA. 2006. *Mamíferos de Argentina: sistemática y distribución*. Ed. por SAREM. Tucumán.
- Barragan VA, Mejia ME, Trávez A, Zapata S, Hartskeerl RA, Haake DA y Trueba GA. 2011. «Interactions of *Leptospira* with Environmental Bacteria from Surface Water». *Curr Microbiol* 62: 1802-6.
- Barragan VA, Nieto N, Keim P y Pearson T. 2017a. «Meta-analysis to estimate the load of *Leptospira* excreted in urine: beyond rats as important sources of transmission in low-income rural communities». *BMC Res Notes* 10 (71). doi:[10.1186/s13104-017-2384-4](https://doi.org/10.1186/s13104-017-2384-4).
- Barragan VA, Olivás S, Keim P y Pearson T. 2017b. «Critical knowledge gaps in our understanding of environmental cycling and transmission of *Leptospira* spp.» *Appl Environ Microb* 83 (19): e01190-17.
- Bartoń K. 2017. *MuMIn: Multi-model inference. Version 1.40.0*. <http://cran.r-project.org/package=MuMIn>.
- Bates D, Mächler M, Bolker B y Walker S. 2014. «Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4». *J Stat Softw* 67 (1). doi:[10.18637/jss.v067.i01](https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01).
- Benacer D, Woh PY, Mohd Zain SN, Amran F y Thong KL. 2013. «Pathogenic and Saprophytic *Leptospira* Species in Water and Soils from Selected Urban Sites in Peninsular Malaysia». *Microbes Environ* 28 (1): 135-40.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR y Gotuzzo E. 2003. «Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance». *Lancet Infect Dis* 3 (12): 757-71.
- Bhaskaran K, Gasparrini A, Hajat S, Smeeth L y Armstrong B. 2013. «Time series regression studies in environmental epidemiology». *Int J Epidemiol* 42 (4): 1187-95.
- Bonaventura SM, Pancotto V, Madanes N y Vicari R. 2003. «Microhabitat use and density of sigmodontine rodents in *Spartina densiflora* freshwater marshes, Argentina». *Mammalia* 67 (3): 367-78.

- Bonvicino CR, Fernandes FA, Viana MC, Teixeira BR y D'Andrea PS. 2013. «*Scapteromys aquaticus* (Rodentia: Sigmodontinae) in Brazil with comments on karyotype and phylogenetics relationships». *Zoologia (Curitiba)* 30 (2): 242-47.
- Boonsilp S, Thaipadungpanit J, Amornchai P, Wuthiekanun V, Bailey MS, Holden MTG, Zhang C, Jiang X, Koizumi N, Taylor K, Galloway R, Hoffmaster AR, Craig S, Smythe LD, Hartskeerl RA, Day NP, Chantratita N, Feil EJ, Aanensen DM, Spratt BG y Peacock SJ. 2013. «A Single Multilocus Sequence Typing (MLST) Scheme for Seven Pathogenic *Leptospira* Species». *PLoS Negl Trop Dis* 7 (1): e1954.
- Bourhy P, Collet L, Brisse S y Picardeau M. 2014. «*Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans». *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 4061-67.
- Bourhy P, Bremont S, Zinini F, Giry C y Picardeau M. 2011. «Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences». *J. Clin. Microbiol.* 49 (6): 2154-60.
- Bovet P, Yersin C, Merien F, Davis CE y Perolat P. 1999. «Factors associated with clinical leptospirosis: a population-based case-control study in the Seychelles (Indian Ocean).» *Int J Epidemiol* 28: 583-90.
- Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC y Weyant RS. 1999. «Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies». *Int J Syst Bacteriol* 49 (2): 839-58.
- Brihuega B, Auteri C, Romero G y Samartino L. 2006. «Aislamiento de una cepa patogena de *Leptospira* de un río urbano respuesta frente a quinolonas fluoradas». *Rev Med Vet* 87 (4): 144-46.
- Brihuega B, Samartino L, Auteri C, Venzano A y Caimi K. 2012. «In vivo cell aggregations of a recent swine biofilm-forming isolate of *Leptospira interrogans* strain from Argentina». *Rev Argent Microbiol* 44 (44): 138-43.
- Brooks ME, Kristensen K, Benthem KJ van, Magnusson A, Berg CW, Nielsen A, Skaug HJ, Mächler M y Bolker B. 2017. «glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling». *The R Journal* 9 (2): 378-400.
- Burnham KP, Anderson DR y Huyvaert KP. 2011. «AIC model selection and multimodel inference in behavioral ecology: Some background, observations, and comparisons». *Behav Ecol Sociobiol* 65 (1): 23-35.

- Cacchione RA, Cascelli ES y Martínez ES. 1975. «Encuesta serológica sobre leptospirosis humana en Argentina». *Rev Asoc Argent Microbiol* 7:21-27.
- Calderón A, Rodríguez V, Máttar S y Arrieta G. 2014. «Leptospirosis in pigs, dogs, rodents, humans, and water in an area of the Colombian tropics». *Trop Anim Health Prod* 46 (2):427-32.
- Cameron CE. 2015. «Leptospiral structure, physiology, and metabolism». En *Leptospira and Leptospirosis*, ed. por Adler B, 21-41. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 387. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Cameron CE, Zuerner RL, Raverty S, Colegrove Km, Norman SA, Lambourn DM, Jeffries SJ y Gulland FM. 2008. «Detection of Pathogenic *Leptospira* Bacteria in Pinniped Populations via PCR and Identification of a Source of Transmission for Zoonotic Leptospirosis in the Marine Environment». *J Clin Microbiol* 46 (5):1728-33.
- Casanovas-Massana A, Costa F, Riediger IN, Cunha M, Oliveira D de, Mota DC, Sousa E, Querino VA, Nery N, Reis MG, Wunder EA, Diggle PJ y Ko AI. 2018. «Spatial and temporal dynamics of pathogenic *Leptospira* in surface waters from the urban slum environment». *Water Res* 130:176-84.
- CCLA - AAVLD. 2002. *Informe sobre leptospirosis en la República Argentina*. Serie Enfermedades Transmisibles. Publicación monográfica nro. 3. Buenos Aires.
- Céspedes M. 2005. «Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Reemergente». *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 22 (4):290-307.
- Chadsuthi S, Modchang C, Lenbury Y, Iamsirithaworn S y Triampo W. 2012. «Modeling seasonal leptospirosis transmission and its association with rainfall and temperature in Thailand using time-series and ARIMAX analyses». *Asian Pac J Trop Med* 5 (7):539-46.
- Chadsuthi S, Wong-Ekkabut J, Triampo W, Doungchawee G y Triampo D. 2010. «Comparison of the effects of UV-A radiation on *Leptospira interrogans* serovar Bataviae, Canicola and Pomona». *Afr J Biotechnol* 9 (21):3196-206.
- Chan KW, Hsu YH, Hu WL, Pan MJ, Lai JM, Huang KC y Chou SJ. 2014. «Serological and PCR Detection of Feline *Leptospira* in Southern Taiwan». *Vector Borne Zoonotic Dis* 14 (2):118-23.
- Chao A, Chazdon RL, Colwell RK y Shen TJ. 2005. «A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data». *Ecol Lett* 8:148-59.

- Chiani Y. 2013. «Desarrollo y Validación de Técnicas Diagnósticas de Leptospirosis Canina». MSc. Thesis, Universidad Nacional del Litoral.
- Chiani Y, Jacob P, Varni V, Landolt N, Schmeling MF, Pujato N, Caimi K y Vanasco B. 2016. «Isolation and clinical sample typing of human leptospirosis cases in Argentina». *Infect Genet Evol* 37: 245-51.
- Cleveland RB, Cleveland WS, McRae JE y Terpenning I. 1990. «STL: A seasonal-trend decomposition procedure based on loess». *J Off Stat* 6 (1): 3-73.
- Colombo VC, Gamieta I, Grune Loeffler S, Brihuega BF y Beldomenico PM. 2018. «New host species for *Leptospira borgpetersenii* and *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni». *Vet Microbiol* 215 (December 2017): 90-92.
- Congedo L. 2017. *Semi-Automatic Classification Plugin Documentation*. doi:[10.13140/RG.2.1.2137.4884](https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2137.4884).
- Cosson JF, Picardeau M, Mielcarek M, Tatard C, Chaval Y, Suputtamongkol Y, Buchy P, Jittapalapong S, Herbreteau V y Morand S. 2014. «Epidemiology of *Leptospira* Transmitted by Rodents in Southeast Asia». *PLoS Negl Trop Dis* 8 (6): e2902.
- Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson PR, Martinez-Silveira MS, Stein C, Abela-Ridder B y Ko AI. 2015a. «Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review». *PLoS Negl Trop Dis* 9 (9): e0003898.
- Costa F, Martinez-Silveira MS, Hagan JE, Hartskeerl RA, Dos Reis MG y Ko AI. 2012. «Surveillance for Leptospirosis in the Americas, 1996-2005: A Review of Data from Ministries of Health». *Rev Panam Salud Publica* 32 (3): 169-77.
- Costa F, Porter FH, Rodrigues G, Farias H, Tucunduva de Faria M, Wunder EA, Osikowicz LM, Kosoy MY, Reis MG, Ko AI y Childs JE. 2014. «Infections by *Leptospira interrogans*, Seoul Virus, and *Bartonella* spp. Among Norway Rats (*Rattus norvegicus*) from the Urban Slum Environment in Brazil». *Vector Borne Zoonotic Dis* 14 (1): 33-40.
- Costa F, Wunder EA, Oliveira D de, Bisht V, Rodrigues G, Reis MG, Ko AI, Begon M y Childs JE. 2015b. «Patterns in *Leptospira* shedding in Norway rats (*Rattus norvegicus*) from Brazilian slum communities at high risk of disease transmission». *PLoS Negl Trop Dis* 9 (6): e0003819.
- Cudós MC, Landolt N, Jacob P, Schmeling MF, Chiani Y, Brazza S, Gómez Celora A, Anchart E, Uboldi MA y Vanasco NB. 2014. «Vigilancia intensificada de leptospirosis en Santa Fe y Entre Ríos (2012-2013)». *Rev Argent Salud Pública* 5 (18): 24-30.

- Cudós MC, Schmeling MF, Chiani Y, Landolt N, Jacob P, Grubert S, Crombas G y Varnasco NB. 2013. «Descripción de tres brotes de Leptospirosis en escenarios epidemiológicos emergentes». En *1er Simposio Nacional de Vigilancia de la Salud*. Buenos Aires, Argentina.
- D'Elía G y Pardiñas UFJ. 2004. «Systematics of Argentinean, Paraguayan, and Uruguayan Swamp Rats of the Genus *Scapteromys* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae)». *J Mammal* 85 (5): 897-910.
- Davlin SL, Lapiz SM, Miranda ME y Murray KO. 2014. «Knowledge, attitudes, and practices regarding rabies in Filipinos following implementation of the Bohol Rabies Prevention and Elimination Programme». *Epidemiol Infect* 142 (7): 1476-85.
- de Lima Brasil AW, Parentoni RN, Citelli de Farias R, Nery TFL, Vasconcellos SA y Azevedo SS de. 2013. «Anticorpos anti-*Leptospira* spp. em animais mantidos em cativeiro na Paraíba». *Semin Cienc Agrar* 34 (6): 2945-50.
- de Paula Dreer MK, Gonçalves DD, da Silva Caetano IC, Gerônimo E, Menegas PH, Bergo D, Ruiz Lopes-Mori FMR, Benitez A, Freitas JC de, Evers F, Navarro IT y de Almeida Martins L. 2013. «Toxoplasmosis, leptospirosis and brucellosis in stray dogs housed at the shelter in Umuarama municipality, Paraná, Brazil». *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 19 (23). doi:[10.1186/1678-9199-19-23](https://doi.org/10.1186/1678-9199-19-23).
- Della Rossa P, Tantrakarnapa K, Sutdan D, Kasetsinsombat K, Cosson JF, Supputamongkol Y, Chaisiri K, Tran A, Supputamongkol S, Binot A, Lajaunie C y Morand S. 2015. «Environmental factors and public health policy associated with human and rodent infection by leptospirosis: A land cover-based study in Nan province, Thailand». *Epidemiol Infect* 144 (7): 1550-62.
- Dezzutto D, Barbero R, Canale G, Acutis PL, Biolatti C, Dogliero A, Mitzy MD, Francone P, Colzani A, Bergagna S y Gennero MS. 2017. «Detection of *Leptospira* spp. in water Turtle (*Trachemys scripta*) living in ponds of urban parks». *Vet Sci* 4 (4). doi:[10.3390/vetsci4040051](https://doi.org/10.3390/vetsci4040051).
- Dietrich M, Gomard Y, Lagadec E, Ramasindrazana B, Le Minter G, Guernier V, Benlali A, Rocamora G, Markotter W, Goodman SM, Dellagi K y Tortosa P. 2018. «Biogeography of *Leptospira* in wild animal communities inhabiting the insular ecosystem of the western Indian Ocean islands and neighboring Africa». *Emerg Microbes Infect* 7 (57). doi:[10.1038/s41426-018-0059-4](https://doi.org/10.1038/s41426-018-0059-4).
- Dirsmith K, VanDalen K, Fry T, Charles B, VerCauteren K y Duncan C. 2013. «Leptospirosis in Fox Squirrels (*Sciurus niger*) of Larimer County, Colorado, USA». *J Wildl Dis* 49 (3): 641-45.

- Dobigny G, Garba M, Tatar C, Loiseau A, Galan M, Kadaouré I, Rossi JP, Picardeau M y Bertherat E. 2015. «Urban Market Gardening and Rodent-Borne Pathogenic *Leptospira* in Arid Zones: A Case Study in Niamey, Niger». *PLoS Negl Trop Dis* 9 (10): e0004097.
- Dos Santos Paixão M, Alves-Martin MF, Tenorio MdS, Starke-Buzetti WA, Alves ML, Silva DT da, Gonçalves Ferreira A, Floró e Silva M, Sousa LO y Lucheis SB. 2014. «Serology, isolation, and molecular detection of *Leptospira* spp. from the tissues and blood of rats captured in a wild animal preservation centre in Brazil». *Prev Vet Med* 115: 69-73.
- Easterbrook JD, Kaplan JB, Vanasco NB, Reeves WK, Purcell RH, Kosoy MY, Glass GE, Watson J y Klein SL. 2007. «A survey of zoonotic pathogens carried by Norway rats in Baltimore, Maryland, USA». *Epidemiol Infect* 135: 1192-99.
- Ellis WA. 2015. «Animal leptospirosis». En *Leptospira and Leptospirosis*, ed. por Adler B, 99-137. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 387. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Essi MJ y Njoya O. 2013. «Point de vue L'Enquête CAP (Connaissances, Attitudes, Pratiques) en Recherche Médicale». *Heal Sci Dis* 14 (2): 135-36.
- Faine S y Stallman ND. 1982. «Amended Descriptions of the Genus *Leptospira* Noguchi 1917 and the Species *L. interrogans* (Stimson 1907) Wenyon 1926 and *L. biflexa* (Wolbach and Binger 1914) Noguchi 1918». *Int J Syst Bacteriol* 32 (4): 461-63.
- Fang F, Collins-Emerson JM, Cullum A, Heuer C, Wilson PR y Benschop J. 2015. «Shedding and seroprevalence of pathogenic *Leptospira* spp. in sheep and cattle at a New Zealand Abattoir». *Zoonoses Public Health* 62 (4): 258-68.
- Faraway J, Yue R y Xiaofeng W. 2018. *brinla: Bayesian Regression with INLA*.
- Fearnley C, Wakeley PR, Gallego-Beltran J, Dalley C, Williamson S, Gaudie C y Woodward MJ. 2008. «The development of a real-time PCR to detect pathogenic *Leptospira* species in kidney tissue». *Res Vet Sci* 85 (1): 8-16.
- Francois Barbagelata S, Brihuega Fernández B, Grune Loffler S, Gattarello Marcos V, Correa Pérez D, Petrakovsky Melillo J, Gualtieri Serragatta C y Arestegui De Luca M. 2013. «Aislamiento de *Leptospira borgpetersenii* de fuentes de agua en Argentina». *Rev Cubana Med Trop* 65 (2): 177-84.
- Frank D. 2008. «One world, one health, one medicine». *The Canadian veterinary journal = La revue vétérinaire canadienne* 49 (11): 1063-65.

- Fratini F, Turchi B, Ebani VV, Bertelloni F, Galiero A y Cerri D. 2015. «The presence of *Leptospira* in coypus (*Myocastor coypus*) and rats (*Rattus norvegicus*) living in a protected wetland in Tuscany (Italy)». *Vet Arh* 85 (4): 407-14.
- Fung Pui C, Apun K, Jalan J, Maurice Bi L, Su'ut L y Fatma Hash H. 2017. «Microtitre Plate Assay for the Quantification of Biofilm Formation by Pathogenic *Leptospira*». *Res J Microbiol* 12 (2): 146-53.
- Ganoza CA, Matthias MA, Collins-Richards D, Brouwer KC, Cunningham CB, Segura ER, Gilman RH, Gotuzzo E y Vinetz JM. 2006. «Determining Risk for Severe Leptospirosis by Molecular Analysis of Environmental Surface Waters for Pathogenic *Leptospira*». *PLoS Med* 3 (8): e308.
- Ganoza CA, Matthias MA, Saito M, Cespedes M, Gotuzzo E y Vinetz JM. 2010. «Asymptomatic renal colonization of humans in the Peruvian Amazon by *Leptospira*». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4 (2). doi:[10.1371/journal.pntd.0000612](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000612).
- Gatti M, Arias D, Rossetti C, Selva S, Copes J, Laplace R, Martino P, Pellicer K y Stanchi N. 2004. «Investigación de leptospirosis en aguas de lagos del zoológico de La Plata, Argentina». *Analecta Vet* 24 (1): 18-20.
- Glass GE, Childs JE, Korch GW y LeDuc JW. 1988. «Association of Intraspecific Wounding with Hantaviral Infection in Wild Rats (*Rattus norvegicus*)». *Epidemiology* 101 (2): 459-72.
- Gomard Y, Dietrich M, Wieseke N, Ramasindrazana B, Lagadec E, Goodman SM, Dellagi K y Tortosa P. 2016. «Malagasy bats shelter a considerable genetic diversity of pathogenic *Leptospira* suggesting notable host-specificity patterns». *FEMS Microbiol Ecol* 92 (4): 1-12.
- Gomes DO, Ramos GB, Alves VBA, Ciuffa AZ, Cuccato LP, Reis TFM dos, Lima AMC, Gonçalves MC, Tolesano GV, Rodrigues VS y Szabo MPJ. 2017. «Occurrence of anti-*Leptospira* spp. antibodies in *Rhipidomys* spp. from a forest fragment of the Brazilian Cerrado». *Trop Anim Health Prod* 49 (3): 555-59.
- Gomes DO, Gonçalves da Silva Chagas L, Bim Ramos G, Zago Ciuffa A, Rezende ML, Pinho Cuccato L, Martins dos Reis TF, Cabral Pires B y Monteiro Correia Lima A. 2018. «Biofilm Production of *Leptospira* spp. Strains». *Acta Scientiae Veterinariae* 46 (1597). doi:[1679-9216.8689151597](https://doi.org/10.1679-9216.8689151597).
- Gómez Villafañe IE, Miño MH, Cavia R, Hodara K, Courtalón P, Suarez O y Busch M. 2005. *Guía de roedores de la Provincia de Buenos Aires. L.O.L.A. (Literature of Latin America)*.

- Gonzalez-Astudillo V, Bustamante-Rengifo JA, Bonilla Á, Lehmicke AJJ, Castillo A y Astudillo-Hernández M. 2016. «Synanthropic cockroaches (Blattidae: *Periplaneta* spp.) harbor pathogenic *Leptospira* in Colombia». *J Med Entomol* 53 (1): 177-82.
- Gordon Smith CE y Turner LH. 1961. «The Effect of pH on the Survival of Leptospire in Water». *Bull Wld Hlth Org* 24: 35-43.
- Gozzi AC, Guichón ML, Benitez VV, Romero GN, Auteri C y Brihuega B. 2013. «First isolation of *Leptospira interrogans* from the arboreal squirrel *Callosciurus erythraeus* introduced in Argentina». *Wildlife Biol* 19 (4): 483-89.
- Gracie R, Barcellos C, Magalhães M, Souza-Santos R y Guimarães Barrocas PR. 2014. «Geographical Scale Effects on the Analysis of Leptospirosis Determinants». *Int J Environ Res Public Health* 11 (10): 10366-83.
- Grier S y Bryant CA. 2005. «Social Marketing in Public Health». *Ann Rev Public Health* 26 (1): 319-39.
- Grune Loffler S, Leiva CL, Scialfa E, Redondo LM, Florin-Christensen M, Martinez M, Romero G y Brihuega B. 2016. «Detection of Pathogenic Leptospiral DNA Traces in Canine Sera Serum Samples by Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)». *Immunology and Infectious Diseases* 4 (4): 39-43.
- Grune Loffler S, Passaro D, Samartino L, Soncini A, Romero G y Brihuega B. 2014a. «Genotypes of *Leptospira* spp. strains isolated from dogs in Buenos Aires, Argentina». *Rev Argent Microbiol* 46 (3): 201-4.
- Grune Loffler S, Pavan ME, Vanasco B, Samartino L, Suarez O, Auteri C, Romero G y Brihuega B. 2014b. «Genotypes of pathogenic *Leptospira* spp isolated from rodents in Argentina». *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109 (2): 163-67.
- Grune Loffler S, Rago V, Martinez M, Uhart M, Florin-Christensen M, Romero G y Brihuega B. 2015. «Isolation of a seawater tolerant *Leptospira* spp. from a southern right whale (*Eubalaena australis*)». *PLoS One* 10 (12). doi:10.1371/journal.pone.0144974.
- Haake DA. 2000. «Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis». *Microbiology* 146 (7): 1491-504.
- Haake DA y Levett PN. 2015. «Leptospirosis in humans». En *Leptospira and Leptospirosis*, ed. por Adler B, 65-97. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 387. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Haake DA y Matsunaga J. 2010. «*Leptospira*: A Spirochete with a Hybrid Outer Membrane.» *Mol Microbiol* 77 (4): 805-14.

- Hagan JE, Moraga P, Costa F, Capian N, Ribeiro GS, Wunder EA, Felzemburgh RDM, Reis RB, Nery N, Santana FS, Fraga D, Santos BL dos, Santos AC, Queiroz A, Tassinari W, Carvalho MS, Reis MG, Diggle PJ y Ko AI. 2016. «Spatiotemporal Determinants of Urban Leptospirosis Transmission: Four-Year Prospective Cohort Study of Slum Residents in Brazil». *PLoS Negl Trop Dis* 10 (1):1-16.
- Halekoh U y Højsgaard S. 2014. «A Kenward-Roger Approximation and Parametric Bootstrap Methods for Tests in Linear Mixed Models - The R Package pbrtest». *J Stat Softw* 59 (9). doi:[10.18637/jss.v059.i09](https://doi.org/10.18637/jss.v059.i09).
- Hartskeerl RA, Collares-Pereira M y Ellis WA. 2011. «Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world». *Clin Microbiol Infect* 17 (4):494-501.
- Hazra A y Gogtay N. 2016a. «Biostatistics series module 3: Comparing groups: Numerical variables». *Indian J Dermatol* 61 (3):251.
- Hazra A y Gogtay N. 2016b. «Biostatistics series module 4: Comparing groups - categorical variables». *Indian J Dermatol* 61 (4):385.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL y DeWaard JR. 2003. «Biological identifications through DNA barcodes». *Proc Biol Sci* 270 (1512):313-21.
- Herbreteau V, Jittapalapong S, Rerkamnuaychoke W, Chaval Y, Cosson JF y Morand S, eds. 2011. *Protocols for field and laboratory rodent studies*. Kasetsart University. http://www.ceropath.org/FichiersComplementaires/Herbreteau%7B%5C_%7DRodents%7B%5C_%7Dprotocols%7B%5C_%7D2011.pdf.
- Heshmat R, Abdollahi Z, Ghotbabadi FS, Rostami M, Shafiee G, Qorbani M, Rezaei Homami M, Larijani B y Salehi F. 2016. «Nutritional knowledge, attitude and practice toward micronutrients among Iranian households: The NUTRI-KAP survey». *J Diabetes Metab Disord* 15 (42). doi:[10.1186/s40200-016-0260-8](https://doi.org/10.1186/s40200-016-0260-8).
- Hickman DL y Swan M. 2010. «Use of a body condition score technique to assess health status in a rat model of polycystic kidney disease». *J Am Assoc Lab Anim Sci* 49 (2):155-59.
- Himsworth CG, Bidulka J, Parsons Kl, Feng AYT, Tang P, Jardine CM, Kerr T, Mak S, Robinson J y Patrick DM. 2013a. «Ecology of *Leptospira interrogans* in Norway Rats (*Rattus norvegicus*) in an Inner-City Neighborhood of Vancouver, Canada». *PLoS Negl Trop Dis* 7 (6):e2270.

- Himsworth CG, Parsons KL, Jardine C y Patrick DM. 2013b. «Rats, Cities, People, and Pathogens: A Systematic Review and Narrative Synthesis of Literature Regarding the Ecology of Rat-Associated Zoonoses in Urban Centers». *Vector Borne Zoonotic Dis* 13 (6): 349-59.
- Houemenou G, Ahmed A, Libois R y Hartskeerl RA. 2013. «*Leptospira spp* . Prevalence in Small Mammal Populations in Cotonou , Benin». *ISRN Epidemiol* 2013:1-8.
- Hovind-Hougen K. 1979. «Leptospiraceae, a New Family to Include *Leptospira* Noguchi 1917 and *Leptonema* gen. nov.» *Int J Syst Bacteriol* 29 (3): 245-51.
- Hubener R. 1915. «Beitrage zur Aetiologie der Weischen Krankheit». *Mitt I Deut Med Wochenschr* 41:1275.
- Hyndman RJ y Athanasopoulos G. 2018. *Forecasting: principles and practice*. Second Edi. Ed. por OTexts. OTexts.
- Hyndman RJ y Khandakar Y. 2008. «Automatic time series forecasting: The forecast package for R». *J Stat Softw* 27 (3). doi:[10.18637/jss.v027.i03](https://doi.org/10.18637/jss.v027.i03).
- Ido Y, Hoki R, Ito H y Wani H. 1917. «The Rat as a Carrier of *Spirochaeta Icterohaemorrhagiae*, the Causative Agent of Weil'S Disease (Spirochaetosis Icterohaemorrhagica).» *J Exp Med* 26 (3): 341-53.
- Inada R, Ido Y, Hoki R, Kaneko R e Ito H. 1916. «The Etiology, Mode of Infection, and Specific Therapy of Weil'S Disease (Spirochaetosis Icterohaemorrhagica)». *J Exp Med.* 23 (3): 377-402.
- INDEC. 2010. *Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2010*. <https://www.indec.gov.ar/>.
- INER. 2016. *Vigilancia de leptospirosis por el laboratorio en argentina (2016)*. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Dr. E. Coni, Santa Fe, Argentina.
- IPEC - INDEC. *Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2010; Ciudad de Santa Fe por Radio Censal*. [https://www.santafe.gov.ar/index.php/web/content/view/full/163619/\(subtema\)/93664](https://www.santafe.gov.ar/index.php/web/content/view/full/163619/(subtema)/93664).
- IPEC - INDEC. *Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2010; Provincia de Santa Fe*. [https://www.santafe.gov.ar/index.php/web/content/view/full/163622/\(subtema\)/93664](https://www.santafe.gov.ar/index.php/web/content/view/full/163622/(subtema)/93664).

- Ismail S, Wahab NZA, Badya N, Rahman NIA, Yeo CC, Latif AZA y Haque M. 2014. «A Study on the Presence of Pathogenic *Leptospira* spp. in Environmental Water Samples Obtained from Selected Recreational Areas in Terengganu, Malaysia». *Res J Pharm Technol* 7 (10): 1153-57.
- Ivanova S, Herbreteau V, Blasdell K, Chaval Y, Buchy P, Guillard B y Morand S. 2012. «*Leptospira* and rodents in Cambodia: Environmental determinants of infection». *Am J Trop Med Hyg* 86 (6): 1032-38.
- Jobbins SE y Alexander KA. 2015. «Evidence of *Leptospira* sp. infection among a diversity of African wildlife species: Beyond the usual suspects». *Trans R Soc Trop Med Hyg* 109 (5): 349-51.
- Katakweba ASS, Mulungu LS, Eiseb SJ, Mahlaba TA, Makundi RH, Massawe AW, Borremans B y Belmain SR. 2012. «Prevalence of Haemoparasites, Leptospire and Coccobacilli with Potential for Human Infection in the Blood of Rodents and Shrews from Selected Localities in Tanzania, Namibia and Swaziland». *African Zoology* 47 (1): 119-27.
- Khairani-Bejo S, Bahaman AR, Zamri-Saad M y Mutalib AR. 2004. «The survival of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in the Malaysian environment». *J Anim Vet Adv* 3 (3): 123-29.
- Kin MS, Brihuega B, Fort M, Delgado F, Bedotti D y Casanave EB. 2015. «Presencia de anticuerpos contra serovares de *Leptospira* en *Chaetophractus villosus* (Mammalia, Dasypodidae) en la provincia de La Pampa, Argentina». *Rev Argent Microbiol* 47 (1): 41-46.
- Kirkimbayeva Z, Lozowicka B, Biyashev K, Sarsembaeva N, Kuzembekova G y Paritova A. 2015. «Leptospirosis in cattle from markets of Almaty province, Kazakhstan». *Bull Vet Inst Pulawy* 59 (1): 29-35.
- Klarenbeek A y Schüffner WAP. 1933. «Het voorkomen van een afwijkend leptospira-ras in Nederland». *Ned Tijdschr Geneesk* 77: 4271-76.
- Ko AI, Goarant C y Picardeau M. 2009. «*Leptospira*: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen». *Nat Rev Microbiol* 7: 736-47.
- Ko AI, Reis MG, Dourado CMR, Johnson Jr WD, Riley LW y Salvador Leptospirosis Study Group. 1999. «Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil». *Lancet* 354 (9181): 820-25.
- Kolde R. 2019. *phheatmap: Pretty Heatmaps*. <https://cran.r-project.org/package=phheatmap>.

- Lall C, Vinod Kumar K, Vimal Raj R, Vedhagiri K y Vijayachari P. 2016. «Prevalence and Diversity of Leptospire in Different Ecological Niches of Urban and Rural Areas of South Andaman Island». *Microbes Environ* 31 (1): 79-82.
- Langoni H, Kuribara IY, Ferreira Lopes Correa AP, Ullmann LS, Sánchez GP y Lucheis SB. 2016. «Anti-leptospirosis agglutinins in Brazilian capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*)». *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 22 (4). doi:[10.1186/s40409-016-0059-6](https://doi.org/10.1186/s40409-016-0059-6).
- LaRocque RC, Breiman RF, Ari MD, Morey RE, Janan FA, Hayes JM, Hossain MA, Brooks WA y Levett PN. 2005. «Leptospirosis during dengue outbreak, Bangladesh». *Emerg Infect Dis* 11 (5): 766-69.
- Lau CL, Smythe LD, Craig SB y Weinstein P. 2010. «Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: Fuelling the fire?» *Trans R Soc Trop Med Hyg* 104: 631-38.
- Lau CL, Watson CH, Lowry JH, David MC, Craig SB, Wynwood SJ, Kama M y Nilles EJ. 2016. «Human Leptospirosis Infection in Fiji: An Eco-epidemiological Approach to Identifying Risk Factors and Environmental Drivers for Transmission». *PLoS Negl Trop Dis* 10 (1): e0004405.
- Leibler JH, Zakhour CM, Gadhoke P y Gaeta JM. 2016. «Zoonotic and Vector-Borne Infections Among Urban Homeless and Marginalized People in the United States and Europe, 1990-2014». *Vector Borne Zoonotic Dis* 16 (7): 435-44.
- Lelu M, Muñoz-Zanzi C, Higgins B y Galloway R. 2015. «Seroepidemiology of leptospirosis in dogs from rural and slum communities of Los Rios Region, Chile». *BMC Vet Res* 11 (31). doi:[10.1186/s12917-015-0341-9](https://doi.org/10.1186/s12917-015-0341-9).
- Levett PN. 2001. «Leptospirosis». *Clin Microbiol Rev* 14 (2): 296-326.
- Levett PN. 2015. «Systematics of Leptospiraceae». En *Leptospira and Leptospirosis*, ed. por Adler B, 11-20. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 387. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Levett PN, Morey RE, Galloway RL y Steigerwalt AG. 2006. «*Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis». *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 671-73.
- Levett PN, Morey RE, Galloway R, Steigerwalt AG y Ellis WA. 2005. «Reclassification of *Leptospira parva* Hovind-Hougen et al. 1982 as *Turneriella parva* gen. nov., comb. nov.» *Int J Syst Evol Microbiol* 55 (Pt 4): 1497-99.

- Libraty DH, Myint KSA, Murray CK, Gibbons RV, Mammen MP, Endy TP, Li W, Vaughn DW, Nisalak A, Kalayanarooj S, Hospenthal DR, Green S, Rothman AL y Ennis FA. 2007. «A comparative study of leptospirosis and dengue in Thai children». *PLoS Negl Trop Dis* 1 (3): e111.
- Lindtner-Knific R, Vergles-Rataj A, Vlahović K, Zrimšek P y Dovč A. 2013. «Prevalence of antibodies against *Leptospira* sp. in snakes, lizards and turtles in Slovenia». *Acta Vet Scand* 55 (1). doi:10.1186/1751-0147-55-65.
- Lloyd-Smith JO, Greig DJ, Hietala S, Ghneim GS, Palmer L, St Leger J, Grenfell BT y Gulland FMD. 2007. «Cyclical changes in seroprevalence of leptospirosis in California sea lions: Endemic and epidemic disease in one host species?» *BMC Infect. Dis.* 7 (125). doi:10.1186/1471-2334-7-125.
- Lovera R, Fernandez MS, Jacob J, Lucero N, Morici G, Brihuega B, Farace MI, Caracostantogolo J y Cavia R. 2017. «Intrinsic and extrinsic factors related to pathogen infection in wild small mammals in intensive milk cattle and swine production systems». *PLoS Negl Trop Dis* 11 (6): e0005722.
- Lugova H y Wallis S. 2017. «Cross-Sectional Survey on the Dengue Knowledge, Attitudes and Preventive Practices Among Students and Staff of a Public University in Malaysia». *J Community Health* 42: 413-20.
- Maciel EAP, Carvalho ALF de, Nascimento SF, Matos RB de, Gouveia EL, Reis MG y Ko AI. 2008. «Household transmission of *Leptospira* infection in urban slum communities». *PLoS Negl Trop Dis* 2 (1): e154.
- Manitz J, Hempelmann M, Kauermann G, Kuechenhoff H, Shao S, Oberhauser C, Westerheide N y Wiesenfarth M. 2017. *Samplingbook: Survey Sampling Procedures*. <https://cran.r-project.org/package=samplingbook>.
- Marder G, Ruiz RM, Bottinelli OR, Peiretti HA, Zorzo L, Merino DE y Czernik GE. 2008. «Prevalencia de leptospirosis en roedores sinantrópicos de la Ciudad de Corrientes, Argentina. Período Mayo 2005-Junio 2008». *Rev Vet* 19 (2): 150-53.
- Martín UO, Sensevy A, Colombo J y Tramontin V. 2002. «Leptospirosis en la provincia de Santa Fe. Descripción epidemiológica, clínica y socioeconómica». *Medicina* 62 (2): 164-8.
- Mason MR, Encina C, Sreevatsan S y Muñoz-Zanzi C. 2016. «Distribution and Diversity of Pathogenic *Leptospira* Species in Peri-domestic Surface Waters from South Central Chile». *PLoS Negl Trop Dis* 10 (8). doi:10.1371/journal.pntd.0004895.

- Mason MR, Gonzalez M, Hodges JS y Muñoz-Zanzi C. 2015. «Protective practices against zoonotic infections among rural and slum communities from South Central Chile». *BMC Public Health* 15 (1). doi:[10.1186/s12889-015-1964-2](https://doi.org/10.1186/s12889-015-1964-2).
- Matthias MA, Ricaldi JN, Cespedes M, Diaz MM, Galloway RL, Saito M, Steigerwalt AG, Patra KP, Ore CV, Gotuzzo E, Gilman RH, Levett PN y Vinetz JM. 2008. «Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus species* reservoir in the Peruvian Amazon». *PLoS Negl Trop Dis* 2 (4). doi:[10.1371/journal.pntd.0000213](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000213).
- Mayer FQ, Dos Reis EM, Andrade Bezerra AV, Cerva C, Rosa J, Cibulski SP, Sales Lima FE, Pacheco SM y Oliveira Rodrigues R. 2017. «Pathogenic *Leptospira* spp. in bats: Molecular investigation in Southern Brazil». *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 52 (October 2016): 14-18.
- Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G y Girons IS. 1992. «Polymerase Chain Reaction for Detection of *Leptospira* in Clinical Samples». *J Clin Microbiol* 30 (9): 2219-24.
- Mgode GF, Mhamphi GG, Katakweba AS y Thomas M. 2014. «*Leptospira* infections in freshwater fish in Morogoro Tanzania: A hidden public health threat». *Tanzan J Health Res* 16 (2). doi:[10.4314/thrb.v16i2.7](https://doi.org/10.4314/thrb.v16i2.7).
- Millán J, Cevidanes A, Chirife AD, Candela MG y León-Vizcaíno L. 2018. «Risk factors of *Leptospira* infection in Mediterranean periurban micromammals». *Zoonoses Public Health* 65 (1): e79-e85.
- Mohan ARM y Chadee DD. 2011. «Knowledge, attitudes and practices of Trinidadian households regarding leptospirosis and related matters». *Int Health* 3 (2): 131-37.
- Mohd Rahim S, Aziah BD, Mohd Nazri S, Azwany YN, Habshah H, Zahiruddin WM, Zaliha I y Mohamed Rusli A. 2012. «Town Service Workers' Knowledge, Attitude and Practice towards Leptospirosis». *Brunei Darussalam J. Heal.* 5: 1-12.
- Monje LD, Costa FB, Colombo VC, Labruna MB, Antoniazzi LR, Gamieta I, Nava S y Beldomenico PM. 2016. «Dynamics of Exposure to *Rickettsia parkeri* in Cattle in the Paraná River Delta, Argentina». *J Med Entomol* 53 (3): 660-65.
- Moreno LZ, Miraglia F, Marvulo MFV, Silva JCR, Paula CD, Costa BLP, Morais ZM, Ferreira F, Neto JSF, Dellagostin OA, Hartskeerl RA, Vasconcellos SA y Moreno AM. 2016. «Characterization of *Leptospira santarosai* Serogroup Grippotyphosa Serovar Bananal Isolated from Capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Brazil». *J Wildl Dis* 52 (3): 688-93.

- Morey RE, Galloway RL, Bragg SL, Steigerwalt AG, Mayer LW y Levett PN. 2006. «Species-specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing». *J Clin Microbiol* 44 (10): 3510-16.
- MSAL. 2007. *Manual de normas y procedimientos de Vigilancia y Control de Enfermedades de Notificación Obligatoria. Revisión nacional 2007 REPUBLICA ARGENTINA*. Ministerio de Salud de la Nación. <http://www.snvs.msal.gov.ar/descargas/Manual%20de%20Normas%20y%20Procedimientos%202007.pdf>.
- MSAL. 2012a. *Boletín Integrado de Vigilancia - N104 - SE2 - Enero de 2012*. Ministerio de Salud de la Nación, Buenos Aires, Argentina. <https://www.argentina.gob.ar/salud>.
- MSAL. 2012b. *Boletín Integrado de Vigilancia - N119 - SE19 - Mayo de 2012*. Ministerio de Salud de la Nación, Buenos Aires, Argentina.
- MSAL. 2013. *Boletín Integrado de Vigilancia - N200 - SE52 - Diciembre de 2013*. Ministerio de Salud de la Nación, Buenos Aires, Argentina.
- MSAL. 2014. *Enfermedades Infecciosas, Leptospirosis. Guía para el Equipo de Salud*. Dirección de Epidemiología. Ministerio de Salud de la Nación, Buenos Aires, Argentina.
- MSAL. 2015. *Boletín Integrado de Vigilancia - N241- SE1 - Enero de 2015*. Ministerio de Salud de la Nación, Buenos Aires, Argentina.
- MSAL. 2016a. *Boletín Integrado de Vigilancia - N293 - SE2 - Enero de 2016*. Ministerio de Salud de la Nación, Buenos Aires, Argentina.
- MSAL. 2016b. *Boletín Integrado de Vigilancia - N311 - SE21 - Mayo de 2016*. Ministerio de Salud de la Nación, Buenos Aires, Argentina.
- MSAL. 2016c. *Boletín Integrado de Vigilancia - N315 - SE25 - Junio de 2016*. Ministerio de Salud de la Nación, Buenos Aires, Argentina.
- MSAL. 2017. *Boletín Integrado de Vigilancia - N343 - SE2 - Enero de 2017*. Ministerio de Salud de la Nación, Buenos Aires, Argentina.
- MSAL. 2018. *Boletín Integrado de Vigilancia - N393 - SE1 - Enero de 2018*. Ministerio de Salud de la Nación, Buenos Aires, Argentina.
- Muñoz-Zanzi C, Mason MR, Encina C, Astroza A y Romero A. 2014a. «*Leptospira* contamination in household and environmental water in rural communities in southern Chile». *Int J Environ Res Public Health* 11 (7): 6666-80.

- Muñoz-Zanzi C, Mason M, Encina C, Gonzalez M y Berg S. 2014b. «Household Characteristics Associated with Rodent Presence and *Leptospira* Infection in Rural and Urban Communities from Southern Chile». *Am J Trop Med Hyg* 90 (3): 497-506.
- Musacchio HM, Dorigo C, Volpato V y Vicco MH. 2010. «Características clínicas y epidemiológicas de leptospirosis: 10 años de experiencia en Santa Fe , Argentina». *Rev Panam Infectol* 12 (1): 43-46.
- Mwachui MA, Crump L, Hartskeerl RA, Zinsstag J y Hattendorf J. 2015. «Environmental and Behavioural Determinants of Leptospirosis Transmission: A Systematic Review». *PLoS Negl Trop Dis* 9 (9): e0003843.
- Navegantes De Araújo W, Finkmoore B, Ribeiro GS, Reis RB, Felzemburgh RDM, Hagan JE, Reis MG, Ko AI y Costa F. 2013. «Knowledge, attitudes, and practices related to leptospirosis among urban slum residents in Brazil». *Am J Trop Med Hyg* 88 (2): 359-63.
- Nelson L y Clark FW. 1973. «Correction for Sprung Traps in Catch/Effort Calculations of Trapping Results». *Journal of Mammalogy* 54 (1): 295-98.
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MH y Wagner H. 2017. *vegan: Community Ecology Package*. doi:10.4135/9781412971874.n145.
- Pappachan MJ, Sheela M y Aravindan KP. 2004. «Relation of rainfall pattern and epidemic leptospirosis in the Indian state of Kerala». *J Epidemiol Community Health* 58 (12): 1054-55.
- Parkes MW, Bienen L, Breilh J, Hsu LN, McDonald M, Patz JA, Rosenthal JP, Sahani M, Sleigh A y Waltner-Toews D. 2005. «All hands on deck: transdisciplinary approaches to emerging infectious disease». *EcoHealth* 2 (4): 258-72.
- Pebesma E. 2018. *sf: Simple Features for R*. <https://cran.r-project.org/package=sf>.
- Perez-Flores J, Charruau P, Cedeño-Vazquez R y Atilano D. 2017. «Evidence for Wild Crocodiles as a Risk for Human Leptospirosis, Mexico». *Ecohealth* 14 (1): 58-68.
- Perez J, Brescia F, Becam J, Mauron C y Goarant C. 2011. «Rodent Abundance Dynamics and Leptospirosis Carriage in an Area of Hyper-Endemicity in New Caledonia». *PLoS Negl Trop Dis* 5 (10): e1361.
- Perolat P, Chappel RJ, Adler B, Baranton G, Bulach DM, Billingham ML, Letocart M, Merien F y Serrano MS. 1998. «*Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia». *Int J Syst Bacteriol* 48: 851-58.

- Petrakovsky J, Bianchi A, Fisun H, Nájera-Aguilar P y Pereira MM. 2014. «Animal leptospirosis in Latin America and the caribbean countries: Reported outbreaks and literature review (2002-2014)». *Int. J. Environ. Res. Public Health* 11:10770-89.
- Postic D, Riquelme-Sertour N, Merien F, Perolat P y Baranton G. 2000. «Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between *Leptospira* collections: Application to *L. meyeri*». *Res Microbiol* 151 (5):333-41.
- Puche R, Ferrés I, Caraballo L, Rangel Y, Picardeau M, Takiff H e Iraola G. 2018. «*Leptospira venezuelensis* sp. nov., a new member of the intermediate group isolated from rodents, cattle and humans». *Int J Syst Evol Microbiol* 68 (2): 513-17.
- QGIS Development Team. 2018. *QGIS Geographic Information System 3.0 Girona*. <http://www.qgis.org/>.
- R Development Core Team. 2017. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. <http://www.r-project.org/>.
- Ramadass P, Jarvis BDW, Corner RJ, Penny D y Marshall RB. 1992. «Genetic Characterization of Pathogenic *Leptospira* Species by DNA Hybridization». *Int J Syst Bacteriol* 42 (2):215-19.
- Rawlins J, Portanova A, Zuckerman I, Loftis A, Ceccato P, Willingham AL y Verma A. 2014. «Molecular detection of leptospiral DNA in environmental water on St. Kitts». *Int J Environ Res Public Health* 11 (8):7953-60.
- Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RDM, Santana FS, Mohr S, Melendez AXTO, Queiroz A, Santos AC, Ravines RR, Tassinari WS, Carvalho MS, Reis MG y Ko AI. 2008. «Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums». *PLoS Negl Trop Dis* 2 (4):e228.
- Ricardo T, Bergero LC, Bulgarella EP y Previtali MA. 2018a. «Knowledge, attitudes and practices (KAP) regarding leptospirosis among residents of riverside settlements of Santa Fe, Argentina». *PLoS Negl Trop Dis* 12 (5):e0006470.
- Ricardo T, Monje LD, Landolt N, Chiani YT, Schmeling MF, Beldoménico PM, Vanasco NB y Previtali MA. 2018b. «Primer informe de *Leptospira interrogans* en el roedor sigmodontino *Scapteromys aquaticus*». *Rev Panam Salud Publica* 42: e83.
- Ridzlan FR, Bahaman AR, Khairani-Bejo S y Mutalib AR. 2010. «Detection of pathogenic *Leptospira* from selected environment in Kelantan and Terengganu, Malaysia». *Trop Biomed* 27 (3):632-38.

- Ristow P, Bourhy P, Kerneis S, Schmitt C, Prevost MC, Lilenbaum W y Picardeau M. 2008. «Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires». *Microbiology* 154: 1309-17.
- Rittaca M y Vítтори M. 2013. *La Vuelta del Paraguayo, el más islero de la ciudad*. http://www.ellitoral.com/index.php/id%7B%5C%%7D7B%7B%5C_%7D%7B%5C%%7D7Dum/85169-la-vuelta-del-paraguayo-el-ms-islero-de-la-ciudad.
- Rittaca M y Vítтори M. 2014. *El agua, el mayor de los problemas*. http://www.ellitoral.com/index.php/id%7B%5C%%7D7B%7B%5C_%7D%7B%5C%%7D7Dum/105176-el-agua-el-mayor-de-los-problemas.
- Rodriguez J, Blais MC, Lapointe C, Arsenault J, Carioto L y Harel J. 2014. «Serologic and urinary PCR survey of leptospirosis in healthy cats and in cats with kidney disease». *J Vet Intern Med* 28: 284-93.
- Romero-Vivas CM, Thiry D, Rodríguez V, Calderón A, Arrieta G, Mattar S, Cuello M, Levett PN y Falconar AK. 2012. «Caracterización molecular de serovariedades de *Leptospira* aislados de muestras de animales y agua en Colombia». *Biomedica* 33 (1): 179-84.
- Rothenburger JL, Himsforth CG, Nemeth NM, Pearl DL y Jardine CM. 2017. «Environmental Factors and Zoonotic Pathogen Ecology in Urban Exploiter Species». *EcoHealth* 14 (3): 630-41.
- Rothenburger JL, Himsforth CG, Nemeth NM, Pearl DL y Jardine CM. 2018. «Environmental Factors Associated with the Carriage of Bacterial Pathogens in Norway Rats». *EcoHealth* 15 (1): 82-95.
- Rubel D, Seijo A, Cernigoi B, Viale A y Wisnivesky C. 1997. «*Leptospira interrogans* en una población canina del Gran Buenos Aires: variables asociadas con la seropositividad». *Rev Panam Salud Publica* 2 (2): 102-5.
- Rue H, Martino S y Chopin N. 2009. «Approximate Bayesian inference for latent Gaussian models by using integrated nested Laplace approximations». *J R Statist Soc B* 71 (2): 319-92.
- Saito M, Miyahara S, Villanueva SYAM, Aramaki N, Ikejiri M, Kobayashi Y, Guevarra JP, Masuzawa T, Gloriani NG, Yanagihar Y y Yoshida SI. 2014. «PCR and Culture Identification of Pathogenic *Leptospira* spp. from Coastal Soil in Leyte, Philippines, after a Storm Surge during Super Typhoon Haiyan (Yolanda) Mitsumasa». *Appl Environ Microb* 80 (22): 6926-32.

- Saito M, Villanueva SYAM, Chakraborty A, Miyahara S, Segawa T, Asoh T, Ozuru R, Gloriani NG, Yanagihara Y y Yoshida SI. 2013a. «Comparative analysis of *Leptospira* strains isolated from environmental soil and water in the Philippines and Japan». *Appl Environ Microb* 79 (2): 601-9.
- Saito M, Villanueva SYAM, Kawamura Y, Iida KI, Tomida J, Kanemaru T, Kohno E, Miyahara S, Umeda A, Amako K, Gloriani NG y Yoshida SI. 2013b. «*Leptospira idonii* sp. nov., isolated from environmental water». *Int J Syst Evol Microbiol* 63: 2457-62.
- Sakinah SNS, Suhailah S, Jamaluddin TZMT, Norbaya SM y Malina O. 2015. «Seroprevalence of Leptospiral Antibodies and Knowledge, Attitudes and Practices of Leptospirosis to Non High Risk Group in Selangor». *Int J Public Heal Clin Sci* 2 (1): 92-104.
- Salaün L, Mérien F, Gurianova S, Baranton G y Picardeau M. 2006. «Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis». *J. Clin. Microbiol.* 44 (11): 3954-62.
- 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 Vet Res* 11 (1). doi:[10.1186/s12917-015-0369-x](https://doi.org/10.1186/s12917-015-0369-x).
- Samarakoon YM y Gunawardena N. 2013. «Knowledge and self-reported practices regarding leptospirosis among adolescent school children in a highly endemic rural area in Sri Lanka». *Rural Remote Health* 13 (2360). doi:[2360\[pii\]](https://doi.org/10.2306/pii132360).
- Sanders EJ, Rigau-Pérez JG, Smits HL, Deseda CC, Vorndam VA, Aye T, Spiegel RA, Weyant RS y Bragg SL. 1999. «Increase of leptospirosis in dengue-negative patients after a hurricane in Puerto Rico in 1996 [correction of 1966].» *Am J Trop Med Hyg* 61 (3): 399-404.
- Sanmartino M, Amieva C, Balsalobre A, Carrillo A, Marti G, Medone P, Mordeglia C, Reche VA, Scazolla MS y García D. 2015. *Hablamos de Chagas: aportes para re-pensar la problemática con una mirada integral*. 1.^a ed. Ed. por CONICET - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- Sarkar U, Nascimento SF, Barbosa R, Martins R, Nuevo H, Kalafanos I, Grunstein I, Flannery B, Dias J, Riley LW, Reis MG y Ko AI. 2002. «Population-Based Case-Control Investigation of Risk Factors for Leptospirosis During an Urban Epidemic». *Am J Trop Med Hyg* 66 (5): 605-10.

- Sasse D y Reuter G. 1978. «Survival ability of *Leptospira pomona* in kidney and muscle tissue of slaughtered pigs in freezing temperatures». *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 91 (7): 130-36.
- Schneider AG, Casanovas-Massana A, Hacker KP, Wunder EA, Begon M, Reis MG, Childs JE, Costa F, Lindow JC y Ko AI. 2018. «Quantification of pathogenic *Leptospira* in the soils of a Brazilian urban slum». *PLoS Negl Trop Dis* 12 (4): e0006415.
- Schneider MC, Leonel DG, Hamrick PN, Pacheco De Caldas E, Velasquez RT, Mendi-gaña Paez FA, Gonzales Arrebato JC, Gerger A, Pereira MM y Aldighieri S. 2017. «Leptospirosis in Latin America: exploring the first set of regional data». *Rev Panam Salud Publica* 41: e81.
- Schneider MC, Tirado MC, Rereddy S, Dugas R, Borda MI, Peralta EA, Aldighieri S y Cosivi O. 2012. «Natural disasters and communicable diseases in the Americas: contribution of veterinary public health». *Vet. Ital. Vet Ital* 48 (2): 193-218.
- Scialfa E, Bolpe J, Bardón JC, Ridao G, Gentile J y Gallicchio O. 2010. «Isolation of *Leptospira interrogans* from suburban rats in Tandil, Buenos Aires, Argentina». *Rev Argent Microbiol* 42: 126-28.
- Scialfa E, Brihuega B, Venzano A, Morris WE, Bolpe J y Schettino M. 2013. «First Isolation of *Leptospira interrogans* from *Lycalopex griseus* (South American Gray Fox) in Argentina Shows New MLVA Genotype». *J Wildl Dis* 49 (1): 168-72.
- Scialfa E, Grune S, Brihuega B, Aguirre P y Rivero M. 2017. «Isolation of saprophytic *Leptospira* spp. from a selected environmental water source of Argentina». *Rev Argent Microbiol* 50 (3): 323-26.
- Seijo A, Coto H, Juan JS, Videla J, Deodato B, Cernigoi B, Messina OG, Collia O, De Bassadoni D, Schtirbu R, Olenchuk A, De Mazzonelli GD y Parma A. 2002. «Lethal leptospiral pulmonary hemorrhage: An emerging disease in Buenos Aires, Argentina». *Emerg Infect Dis* 8 (9): 1004-5.
- Semskov MV. 1940. «To the materials on etiology of infectious yellow fever of cattle». *Sovetskaya Veterinaria* 6: 22-23.
- Sengupta M, Prabhakar AK, Satyendra S, Thambu D, Abraham OC, Balaji V, Chen HW, Chao CC, Ching WM y Prakash J. 2017. «Utility of loop-mediated isothermal amplification assay, polymerase chain reaction, and ELISA for diagnosis of leptospirosis in South Indian patients». *J Glob Infect Dis* 9 (1). doi:10.4103/0974-777X.192967.
- Servicio Meteorológico Nacional. 2018. *Caracterización: Estadísticas de largo plazo*. <http://www.smn.gov.ar/caracterizacion-estadisticas-de-largo-plazo>.

- Sikes RS. 2016. «2016 Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education». *J Mammal* 97 (3):663-88.
- Slack AT, Kalambaheti T, Symonds ML, Dohnt MF, Galloway RL, Steigerwalt AG, Chai-cumpa W, Bunyaraksyotin G, Craig S, Harrower BJ y Smythe LD. 2008. «*Leptospira wolffii* sp. nov., isolated from a human with suspected leptospirosis in Thailand». *Int J Syst Evol Microbiol* 58 (10):2305-8.
- Slack AT, Khairani-Bejo S, Symonds ML, Dohnt MF, Galloway RL, Steigerwalt AG, Bahaman AR, Craig S, Harrower BJ y Smythe LD. 2009. «*Leptospira kmetyi* sp. nov., isolated from an environmental source in Malaysia». *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 705-8.
- Smythe L, Adler B, Hartskeerl RA, Galloway RL, Turenne CY y Levett PN. 2013. «Classification of *Leptospira* genomospecies 1, 3, 4 and 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthielii* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov. and *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively». *Int J Syst Evol Microbiol* 63: 1859-62.
- Sonthayanon P, Chierakul W, Wuthiekanun V, Thaipadungpanit J, Kalambaheti T, Boon-silp S, Amornchai P, Smythe LD, Limmathurotsakul D y Day NP. 2011. «Accuracy of loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of human leptospirosis in Thailand». *Am J Trop Med Hyg* 84 (4):614-20.
- Stimson AM. 1907. «Note on an Organism Found in Yellow-Fever Tissue». *Public Health Reports (1896-1970)* 22 (541). doi:[10.2307/4559008](https://doi.org/10.2307/4559008).
- Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K y Hoffmaster AR. 2009. «Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene». *Diagn Micr Infec Dis* 64 (3):247-55.
- Suepaul SM, Carrington CVF, Campbell M, Borde G y Adesiyun AA. 2010. «Serovars of *Leptospira* isolated from dogs and rodents». *Epidemiol Infect* 138 (7):1059-70.
- Suwancharoen D, Sittiwicheanwong B y Wiratsudakul A. 2016. «Evaluation of loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) for pathogenic *Leptospira* spp. detection with leptospire isolation and real-time PCR». *J Vet Med Sci* 78 (8): 1299-302.
- Takabe K, Nakamura S, Ashihara M y Kudo S. 2013. «Effect of osmolarity and viscosity on the motility of pathogenic and saprophytic *Leptospira*». *Microbiol Immunol* 57 (3):236-39.
- Teferi J y Shewangizaw Z. 2015. «Assessment of knowledge, attitude, and practice related to epilepsy: A community-based study». *Neuropsychiatr Dis Treat* 11:1239-46.

- Theuerkauf J, Perez J, Taugamoia A, Niutoua I, Labrousse D, Gula R, Bogdanowicz W, Jourdan H y Goarant C. 2013. «Leptospirosis risk increases with changes in species composition of rat populations». *Naturwissenschaften* 100: 385-88.
- Theuerkauf J, Rouys S, Jourdan H y Gula R. 2011. «Efficiency of a New Reverse-Bait Trigger Snap Trap for Invasive Rats and a New Standardised Abundance Index». *Ann Zool Fennici* 48 (5): 308-18.
- Thibeaux R, Geroult S, Benezech C, Chabaud S, Soupé-Gilbert ME, Girault D, Bierque E y Goarant C. 2017. «Seeking the environmental source of Leptospirosis reveals durable bacterial viability in river soils». *PLoS Negl Trop Dis* 11 (2). doi:[10.1371/journal.pntd.0005414](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005414).
- Thibeaux R, Iraola G, Ferrés I, Bierque E, Girault D, Soupé-Gilbert ME, Picardeau M y Goarant C. 2018. «Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence». *Microb Genom* 4. doi:[10.1099/mgen.0.000144](https://doi.org/10.1099/mgen.0.000144).
- Torgerson PR, Hagan JE, Costa F, Calcagno J, Kane M, Martinez-Silveira MS, Goris MGAA, Stein C, Ko AI y Abela-Ridder B. 2015. «Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years». *PLoS Negl Trop Dis* 9 (10): e0004122.
- Torres-Castro M, Cruz-Camargo B, Medina-Pinto R, Reyes-Hernández B, Moguel-Lehmer C, Medina R, Ortiz-Esquivel J, Arcila-Fuentes W, López-Ávila A, Noh-Pech H, Pantimay A, Rodríguez-Vivas I y Puerto FI. 2018. «Detección molecular de leptospiras patógenas en roedores sinantrópicos y silvestres capturados en Yucatán, México». *Biomédica* 38 (3): 51-58.
- Trochmann Cordeiro C, da Costa Vieira RF y Tostes de Oliveira S. 2017. «Anticorpos anti-*Leptospira* spp. e leptospirúria em gatos na região metropolitana de Curitiba/PR-Brasil». *Archives of Veterinary Science* 22 (4): 131-38.
- Trueba GA, Zapata S, Madrid K, Cullen P y Haake DA. 2004. «Cell aggregation: A mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water». *Int Microbiol* 7: 35-40.
- Tucunduva de Faria M, Calderwood MS, Athanazio DA, McBride AJAA, Hartskeerl RA, Pereira MM, Ko AI y Reis MG. 2008. «Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil». *Acta Tropica* 108 (1): 1-5.
- Uhlenhuth P y Fromme W. 1915. «Experimentelle Untersuchungen über die sogenannte Weilsche Krankheit (ansteckende Gelbsucht)». *Med Klin* 44: 1202-3.

- Vanasco NB, Fusco S, Zanuttini JC, Manattini S, Dalla Fontana ML, Prez J, Cerrano D y Sequeira MD. 2002. «Brote de leptospirosis humana luego de una inundación. Reconquista (Santa Fe), 1998». *Rev Argent Microbiol* 34 (3):124-31.
- Vanasco NB, Jacob P, Landolt N, Chiani Y, Schmeling MF, Cudos C, Tarabla H y Lottersberger J. 2016. «Diagnostic accuracy of an IgM enzyme-linked immunosorbent assay and comparison with 2 polymerase chain reactions for early diagnosis of human leptospirosis». *Diagn Micr Infec Dis* 84 (4):292-97.
- Vanasco NB, Lottersberger J, Sequeira MD y Tarabla H. 2001. «Development and validation of an ELISA for the detection of leptospire-specific antibodies in rodents». *Vet Microbiol* 82: 321-30.
- Vanasco NB, Schmeling MF, Lottersberger J, Costa F, Ko AI y Tarabla HD. 2008. «Clinical characteristics and risk factors of human leptospirosis in Argentina (1999-2005)». *Acta Tropica* 107 (3):255-58.
- Vanasco NB, Sequeira G, Dalla Fontana ML, Fusco S, Sequeira MD y Enría D. 2000. «Descripción de un brote de leptospirosis en la ciudad de Santa Fe, Argentina, marzo-abril de 1998». *Rev Panam Salud Publica* 7 (1):35-40.
- Vanasco NB, Sequeira MD, Sequeira G y Tarabla HD. 2003. «Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and environmental characteristics in Argentina». *Prev Vet Med* 60 (3):227-35.
- Vega-Corredor M y Opadeyi J. 2014. «Hydrology and public health: linking human leptospirosis and local hydrological dynamics in Trinidad, West Indies». *Earth Perspectives* 1 (3). doi:[10.1186/2194-6434-1-3](https://doi.org/10.1186/2194-6434-1-3).
- Vein J, Leblond A, Belli P, Kodjo A y Berny PJ. 2014. «The role of the coypu (*Myocastor coypus*), an invasive aquatic rodent species, in the epidemiological cycle of leptospirosis: A study in two wetlands in the East of France». *Eur J Wildl Res* 60:125-33.
- Vein J, Perrin A, Berny PJ, Benoit E, Leblond A y Kodjo A. 2012. «Adaptation of a real-time PCR method for the detection and quantification of pathogenic leptospire in environmental water». *Can J Microbiol* 58 (7):828-35.
- Vengust G, Lindtner-Knific R, Zele D y Bidovec A. 2008. «*Leptospira* antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) in Slovenia». *Eur J Wildl Res* 54 (4):749-52.
- Viau EJ y Boehm AB. 2011. «Quantitative PCR-based detection of pathogenic *Leptospira* in Hawai'ian coastal streams». *J Water Health* 9 (4):637-46.

- Victoria B, Ahmed A, Zuerner RL, Ahmed N, Bulach DM, Quinteiro J y Hartskeerl RA. 2008. «Conservation of the S10-spc-a locus within otherwise highly plastic genomes provides phylogenetic insight into the genus *Leptospira*». *PLoS One* 3 (7). doi:[10.1371/journal.pone.0002752](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002752).
- Vieira AS, Narduche L, Martins G, Schabib Péres IAHF, Zimmermann NP, Juliano RS, Pellegrin AO y Lilenbaum W. 2016. «Detection of wild animals as carriers of *Leptospira* by PCR in the Pantanal biome, Brazil». *Acta Tropica* 163: 87-89.
- Vijayachari P, Sugunan AP y Shriram AN. 2008. «Leptospirosis: An emerging global public health problem». *J Biosci* 33 (4): 557-69.
- Villanueva SYAM, Ezoe H, Baterna RA, Yanagihara Y, Muto M, Koizumi N, Fukui T, Okamoto Y, Masuzawa T, Cavinta LL, Gloriani NG y Yoshida SI. 2010. «Serologic and molecular studies of *Leptospira* and leptospirosis among rats in the Philippines». *Am J Trop Med Hyg* 82 (5): 889-98.
- Villanueva SYAM, Saito M, Baterna RA, Estrada CAM, Rivera AKB, Dato MC, Zamora PRFC, Segawa T, Cavinta LL, Fukui T, Masuzawa T, Yanagihara Y, Gloriani NG, Yoshida S ichi y Yoshida S. 2014. «*Leptospira*-rat-human relationship in Luzon, Philippines». *Microbes Infect* 16 (11): 902-10.
- Vinod Kumar K, Lall C, Vimal Raj R, Vedhagiri K y Vijayachari P. 2015. «Coexistence and survival of pathogenic leptospires by formation of biofilm with *Azospirillum*». *FEMS Microbiol Ecol* 91 (6). doi:[10.1093/femsec/fiv051](https://doi.org/10.1093/femsec/fiv051).
- Vinod Kumar K, Lall C, Vimal Raj R, Vedhagiri K y Vijayachari P. 2016. «Molecular detection of pathogenic leptospiral protein encoding gene (lipL32) in environmental aquatic biofilms». *Lett Appl Microbiol* 62 (4): 311-15.
- Vital-Brazil JM, Balassiano IT, Oliveira FS de, Dias de Sousa Costa A, Hillen L y Pereira MM. 2010. «Multiplex PCR-based detection of *Leptospira* in environmental water samples obtained from a slum settlement». *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105 (3): 353-55.
- Ward MP. 2002. «Seasonality of canine leptospirosis in the United States and Canada and its association with rainfall». *Prev Vet Med* 56: 203-13.
- Weil A. 1886. «No Ueber eine eigentümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende akute Infektionskrankheit». *Deutsche Archiv fuer Klinische Medizin* 39: 209-32.
- Weinberger D, Baroux N, Grangeon JP, Ko AI y Goarant C. 2014. «El Niño Southern Oscillation and Leptospirosis Outbreaks in New Caledonia». *PLoS Negl Trop Dis* 8 (4): e2798.

- Weiss S, Rettinger A, Bergmann M, Llewellyn JR, Pantchev N, Straubinger RK y Hartmann K. 2017. «Detection of *Leptospira* DNA in urine and presence of specific antibodies in outdoor cats in Germany». *J Feline Med Surg* 19 (4): 470-76.
- Weiss S, Menezes A, Woods K, Chanthongthip A, Dittrich S, Opoku-Boateng A, Kimuli M y Chalker V. 2016. «An Extended Multilocus Sequence Typing (MLST) Scheme for Rapid Direct Typing of *Leptospira* from Clinical Samples». *PLoS Negl Trop Dis* 10 (9): e0004996.
- WHO. 2003. *Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control*. World Health Organization.
- Wójcik-Fatla A, Zajac V, Wasinski B, Sroka J, Cisak E, Sawczyn A y Dutkiewicz J. 2014. «Occurrence of *Leptospira* DNA in water and soil samples collected in eastern Poland». *Ann Agr Env Med* 21 (4): 730-32.
- Wong YP, Othman S, Lau YL, Son R y Chee HY. 2017. «Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Versatile Technique for Detection of Microorganisms». *J Appl Microbiol* 124: 626-43.
- Wu Q, Prager KC, Goldstein T, Alt DP, Galloway RL, Zuerner RL, Lloyd-Smith JO y Schwacke L. 2014. «Development of a real-time PCR for the detection of pathogenic *Leptospira* spp. in California sea lions». *Dis Aquat Organ* 110 (3): 165-72.
- Wynwood SJ, Graham GC, Weier SL, Collet TA, McKay DB y Craig SB. 2014. «Leptospirosis from water sources». *Pathog Glob Health* 108 (7): 334-38.
- Xu Y, Zhu Y, Wang Y, Chang YF, Zhang Y, Jiang X, Zhuang X, Zhu Y, Zhang J, Zeng L, Yang M, Li S, Wang S, Ye Q, Xin X, Zhao G, Zheng H, Guo X y Wang J. 2016. «Whole genome sequencing revealed host adaptation-focused genomic plasticity of pathogenic *Leptospira*». *Sci Rep* 6. doi:[10.1038/srep20020](https://doi.org/10.1038/srep20020).
- Yamaguchi T, Higa N, Okura N, Matsumoto A, Hermawan I, Yamashiro T, Suzuki T y Toma C. 2018. «Characterizing interactions of *Leptospira interrogans* with proximal renal tubule epithelial cells». *BMC Microbiology* 18 (64). doi:[10.1186/s12866-018-1206-8](https://doi.org/10.1186/s12866-018-1206-8).
- Yasuda PH, Steigerwalt AG, Sulzer KR, Kaufmann AF, Rogers F y Brenner DJ. 1987. «Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven new *Leptospira* species». *Int J Syst Evol Microbiol* 37 (4): 407-15.

Zakeri S, Khorami N, Ganji ZF, Sepahian N, Malmasi AA, Gouya MM y Djadid ND. 2010. «*Leptospira wolffii*, a potential new pathogenic *Leptospira* species detected in human, sheep and dog». *Infect Genet Evol* 10 (2):273-77.

INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

Tabla S1. Clasificación genotípica del género *Leptospira*

Grupo filogenético	Genomoespecie	Publicación
Patógenas (alta virulencia)	<i>L. interrogans</i>	Faine y Stallman (1982)
	<i>L. noguchii</i>	Yasuda y col. (1987)
	<i>L. santarosai</i>	
	<i>L. weilii</i>	
	<i>L. borgpetersenii</i>	
	<i>L. kirschneri</i>	Ramadass y col. (1992)
	<i>L. alexanderi</i>	Brenner y col. (1999)
	<i>L. mayottensis</i>	Bourhy y col. (2014)
<i>L. alstonii</i>	Smythe y col. (2013)	
Patógenas (baja virulencia)	<i>L. kmetyi</i>	Slack y col. (2009)
	<i>L. sp. nov. patho 1</i>	Thibeaux y col. (2018)
	<i>L. sp. nov. patho 2</i>	
	<i>L. sp. nov. patho 3</i>	
Intermedias	<i>L. inadai</i>	Yasuda y col. (1987)
	<i>L. fainei</i>	Perolat y col. (1998)
	<i>L. broomii</i>	Levett y col. (2006)
	<i>L. licerasiae</i>	Matthias y col. (2008)
	<i>L. wolffi</i>	Slack y col. (2008)
	<i>L. venezuelensis</i>	Puche y col. (2018)
	<i>L. sp. nov. inter 1</i>	Thibeaux y col. (2018)
	<i>L. sp. nov. inter 2</i>	
	<i>L. sp. nov. inter 3</i>	
	<i>L. sp. nov. inter 4</i>	
	<i>L. sp. nov. inter 5</i>	
Saprófitas	<i>L. biflexa</i>	Faine y Stallman (1982)
	<i>L. meyeri</i>	Yasuda y col. (1987)
	<i>L. wolbachii</i>	
	<i>L. idonii</i>	Saito y col. (2013a)
	<i>L. terpstrae</i>	Smythe y col. (2013)
	<i>L. vanthiellii</i>	
	<i>L. yanagawae</i>	
	<i>L. sp. nov. sapro 1</i>	Thibeaux y col. (2018)
<i>L. sp. nov. sapro 2</i>		
<i>L. sp. nov. sapro 3</i>		
<i>L. sp. nov. sapro 4</i>		

Tabla elaborada a partir de los datos publicados en Levett (2015) y Thibeaux y col. (2018)

Tabla S2. Serogrupos patógenos asociados a múltiples genomoespecies de *Leptospira*

Serogrupo	Genomoespecies
Australis	<i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. noguchii</i>
Autumnalis	<i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i>
Ballum	<i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i>
Bataviae	<i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i>
Canicola	<i>L. inadai</i> , <i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. wolffi</i>
Celledoni	<i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. weilii</i>
Cynopteri	<i>L. kirschneri</i> , <i>L. santarosai</i>
Djasiman	<i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. noguchii</i>
Grippotyphosa	<i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. santarosai</i>
Hedbdomadis	<i>L. alexanderi</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i>
Icterohaemorrhagiae	<i>L. inadai</i> , <i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. terpstrae</i> , <i>L. weilii</i> <i>L. alexanderi</i> , <i>L. borgpetersenii</i> ,
Javanica	<i>L. inadai</i> , <i>L. meyeri</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. weilii</i>
Louisiana	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i>
Lyme	<i>L. inadai</i> , <i>L. interrogans</i>
Manhao	<i>L. alexanderi</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. weilii</i>
Mini	<i>L. alexanderi</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. mayottensis</i> , <i>L. meyeri</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. weilii</i>
Panama	<i>L. noguchii</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Pomona	<i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i>
Pyrogenes	<i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. weilii</i>
Ranarum	<i>L. alstonii</i> , <i>L. interrogans</i> , <i>L. meyeri</i>
Sarmin	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. weilii</i>
Sejroe	<i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. meyeri</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. weilii</i>
Shermani	<i>L. inadai</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. inadai</i> ,
Tarassovi	<i>L. kirschneri</i> , <i>L. ktmeyi</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. weilii</i>

Tabla construida en base a datos publicados en Levett (2001), Bharti y col. (2003), Ahmed y col. (2006), Salaiin y col. (2006), Slack y col. (2009), Vijayachari y col. (2008), Ganoza y col. (2010), Smythe y col. (2013) y Vanasco y col. (2016)

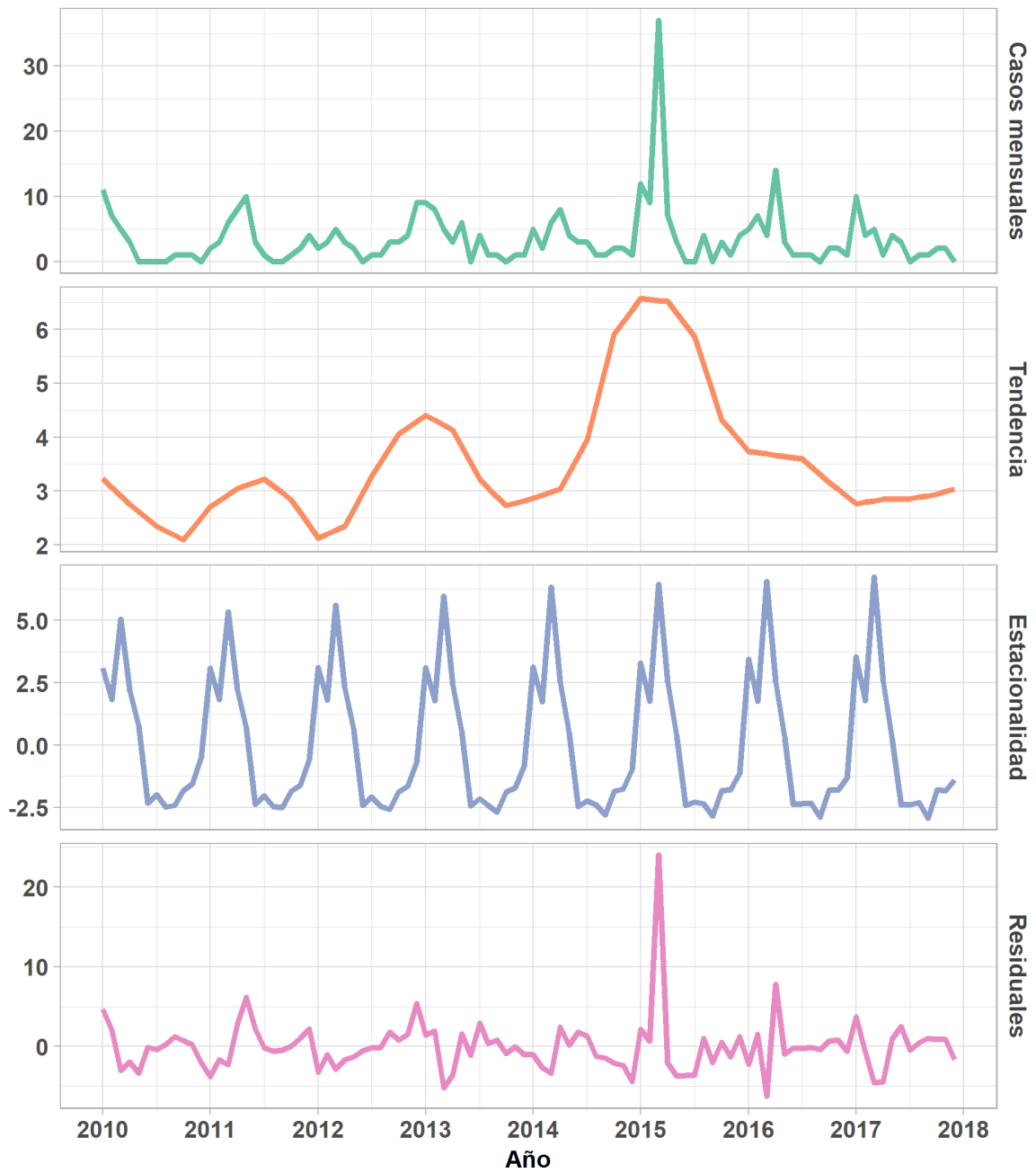


Figura S1. Componentes de la serie temporal de casos mensuales de leptospirosis, Santa Fe, Argentina (2010-2017)

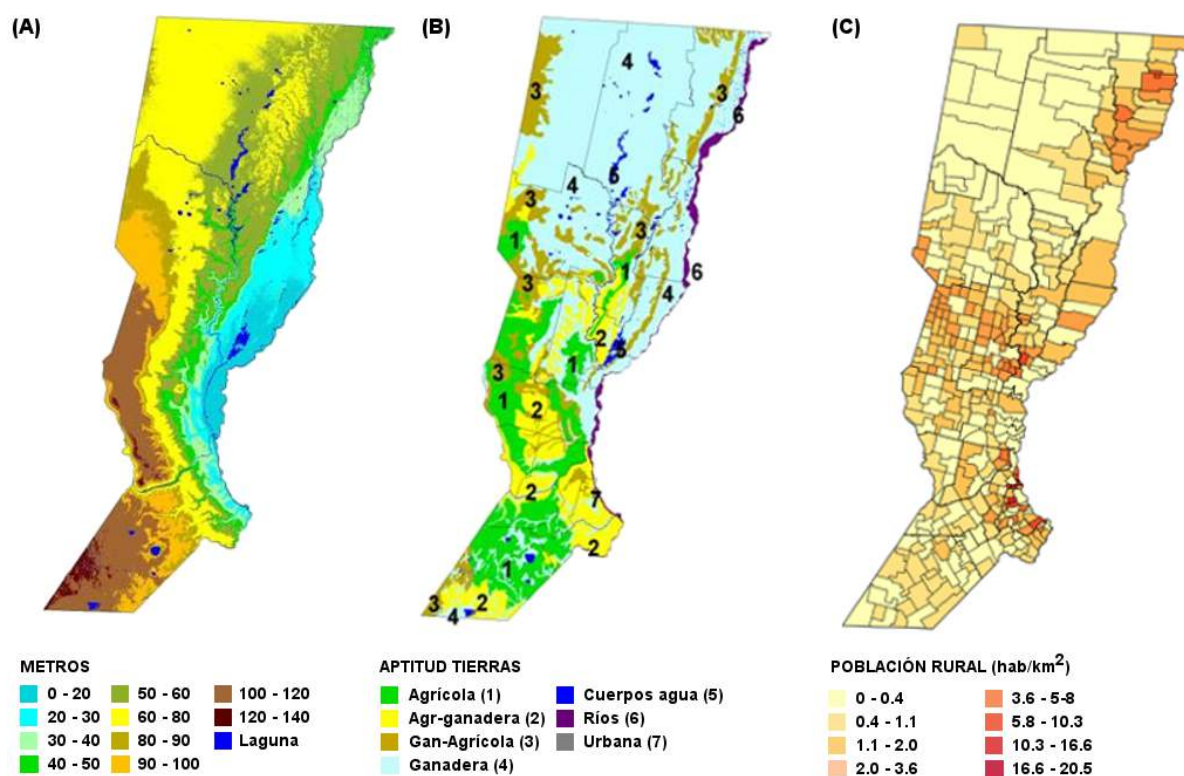


Figura S2. Mapas de ambientes y población rural de Santa Fe. (A) Morfometría de la provincia de Santa Fe; (B) Aptitud de tierras de la provincia de Santa Fe; (C) Densidad poblacional rural por distrito según censo 2010. Fuente: Imágenes editadas a partir de los mapas publicados en [GeoINTA](#) por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y en [Infraestructura de Datos Espaciales Provincia de Santa Fe](#). Autores: (A) G. Cruzate con datos de USGS/NASA SRTM (2006); (B) SAGyP.INTA (1986); (C) Lic. Juan Manuel Bullo (2016).

ENCUESTA INDIVIDUAL

Nombre encuestador:	Fecha:	Nro. Encuesta:	Lugar:	Evacuado	Sí	No
---------------------	--------	----------------	--------	----------	----	----

1. PARA EMPEZAR NECESITO UNOS DATOS SOBRE UD:

Encuestado	Edad	Sexo	Estudios			Occupación
			PI	SI	TI	
		M F	PC	SC	TC	UC

Nota: En la primera columna se coloca la situación del encuestado respecto al jefe de hogar, si es cónyuge, hijo, tío, primo, amigo, etc.

2. ¿REALIZA USTED ALGUNA DE ESTAS ACTIVIDADES?

Actividad	¿Qué tan seguido?		Comentarios
	Frecuentemente	Raramente	
Pescar			
Recolección de leña			
Cazar			
Desmalezar			
Otra/s			

Frecuentemente = 0; Raramente = 1; Nunca = 2

3. ¿QUÉ TIPO DE CALZADO USA CUANDO LAS REALIZA?

Descalzo	Zapatillas/Otro	Botas
----------	-----------------	-------

Descalzo = -2; Zapatillas = -1; Botas = 0

4. ¿VA A LA ISLA? (No: Pase a 6)

 Sí No

5. ¿PASA LA NOCHE EN LA ISLA?

 Sí No

6. SI HA LLOVIDO MUCHO Y UD. NECESITA SALIR DE LA CASA, ¿LE TOCA ATRAVESAR CHARCOS GRANDES PARA LLEGAR A DESTINO?

 Sí No

7. ¿EN ESTOS CASOS SE MOJA LOS PIES?

 Sí No

8. ESTO LE SUCEDE...

Siempre	Casi siempre	A veces	Casi Nunca	Nunca
---------	--------------	---------	------------	-------

9. ¿USA USTED AGUA DEL RÍO/CANAL/LAGUNA/CAVA PARA REGAR/LAVAR/DARLE DE BEBER A LOS ANIMALES? (No: Pase a 11)

 Sí No

10. ¿DE QUÉ LUGAR LA SACA?

11. ¿NADA O SE REFRESCA EN EL RÍO, LAGUNA U OTRO LUGAR DE LA ZONA? (No: Pase a 13)

 Sí No

12. ¿EN QUÉ LUGAR? (nombre y ubicación del lugar)

13. **¿ALGUNA VEZ ESCUCHÓ HABLAR DE LEPTOSPIROSIS?**

(No: Pase a 30)

<input type="checkbox"/>	Sí	<input type="checkbox"/>	No
--------------------------	----	--------------------------	----

14. **PARA UD ¿QUÉ ES LA LEPTOSPIROSIS?**

No deben leerse las opciones (Máx = 3 puntos)

<input type="checkbox"/>	No sé	<input type="checkbox"/>	Los perros se enferman
<input type="checkbox"/>	Una enfermedad	<input type="checkbox"/>	Las personas sangran
<input type="checkbox"/>	Una enfermedad transmitida por las ratas	<input type="checkbox"/>	Viene de las alcantarillas
<input type="checkbox"/>	Una enfermedad que mata	<input type="checkbox"/>	Mucha gente se contagia
<input type="checkbox"/>	Una enfermedad de trabajo	<input type="checkbox"/>	Transmitida por mosquitos
<input type="checkbox"/>	Una enfermedad que da fiebre	<input type="checkbox"/>	Es infecciosa
<input type="checkbox"/>	La persona se pone amarilla	<input type="checkbox"/>	Causada por animales
<input type="checkbox"/>	Asociada a lluvias/Inundaciones	<input type="checkbox"/>	Otra/s

Cual/es?:

15. **¿DÓNDE HA OÍDO HABLAR DE LEPTOSPIROSIS?**

No deben leerse las opciones.

<input type="checkbox"/>	Centro de salud, dispensario, hospital	<input type="checkbox"/>	Trabajo
<input type="checkbox"/>	Medios (televisión, radio, diarios, etc)	<input type="checkbox"/>	Escuela
<input type="checkbox"/>	Conocido, familiar	<input type="checkbox"/>	Vecinal
<input type="checkbox"/>	Otro/s	<input type="checkbox"/>	

16. **¿CUANTAS PERSONAS EN LA CIUDAD DE SANTA FE Y ALREDEDORES CREE USTED QUE SE ENFERMAN AL AÑO?**

<input type="checkbox"/>	Muchas	<input type="checkbox"/>	Algunas	<input type="checkbox"/>	Pocas	<input type="checkbox"/>	No sé
--------------------------	--------	--------------------------	---------	--------------------------	-------	--------------------------	-------

17. **¿CREE UD. QUE EN ALGÚN MOMENTO UNA GRAN CANTIDAD DE PERSONAS PODRÍAN ENFERMARSE DE LEPTOSPIROSIS?**

(Cree que pueda haber un brote de Leptospirosis)

<input type="checkbox"/>	Sí	<input type="checkbox"/>	Tal vez	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	No sé
--------------------------	----	--------------------------	---------	--------------------------	----	--------------------------	-------

18. **¿CONOCE A ALGUIEN QUE HAYA TENIDO ESTA ENFERMEDAD?** (No: pase a 23)

<input type="checkbox"/>	Sí	<input type="checkbox"/>	No
--------------------------	----	--------------------------	----

19. **¿CUÁNTAS PERSONAS?**

20. **ALGUIEN DE SU BARRIO?**

<input type="checkbox"/>	Sí	<input type="checkbox"/>	No
--------------------------	----	--------------------------	----

¿Cuántos?:

21. **¿ALGUIEN DE SU CASA?**

<input type="checkbox"/>	Sí	<input type="checkbox"/>	No
--------------------------	----	--------------------------	----

¿Cuántos?:

22. **¿ALGUNA DE ELLAS MURIÓ POR ESTA ENFERMEDAD?**
(Sí: Pase a 25)

<input type="checkbox"/>	Sí	<input type="checkbox"/>	No
--------------------------	----	--------------------------	----

23. **¿SE PUEDEN CURAR LAS PERSONAS DE ESTA ENFERMEDAD?**

<input type="checkbox"/>	Sí	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	No sé
--------------------------	----	--------------------------	----	--------------------------	-------

24. **¿PUEDE UNA PERSONA MORIRSE POR ESTA ENFERMEDAD?**

<input type="checkbox"/>	Sí	<input type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	No sé
--------------------------	----	--------------------------	----	--------------------------	-------

25. **¿QUÉ SIENTE UNA PERSONA CUANDO TIENE ESTA ENFERMEDAD?** (¿Cuáles son los síntomas?)
(No deben leerse las opciones / Máx = 5 puntos)

<input type="checkbox"/>	No sé	<input type="checkbox"/>	Dolor cabeza
<input type="checkbox"/>	Fiebre	<input type="checkbox"/>	Problema renal
<input type="checkbox"/>	Dolor cuerpo	<input type="checkbox"/>	Dolor piernas
<input type="checkbox"/>	Malestar	<input type="checkbox"/>	Otro/s

¿Cuál/es?:

26. **¿CÓMO LE PARECE QUE UNA PERSONA PUEDE AGARRARSE ESTA ENFERMEDAD?** (¿Cómo se contagia?)
(No deben leerse las opciones / Máx = 4 puntos)

<input type="checkbox"/>	No sé	<input type="checkbox"/>	Orina ratas
<input type="checkbox"/>	Contacto con animales enfermos	<input type="checkbox"/>	Contacto con agua estancada
<input type="checkbox"/>	Limpiando zanjas	<input type="checkbox"/>	Al desmalezar
<input type="checkbox"/>	Picadura mosquitos	<input type="checkbox"/>	Contacto con basura
<input type="checkbox"/>	Por comida/agua contaminada	<input type="checkbox"/>	Por heridas
<input type="checkbox"/>	Por andar descalzo	<input type="checkbox"/>	Por ir a la isla
<input type="checkbox"/>	Otro/s:	<input type="checkbox"/>	

27. **¿QUÉ ANIMALES CREE USTED PUEDEN TRANSMITIR ESTA ENFERMEDAD A LAS PERSONAS?**
(Marcar los mencionados / Máx = 4 puntos)

<input type="checkbox"/>	No sé	<input type="checkbox"/>	Gallinas, aves
<input type="checkbox"/>	Perros	<input type="checkbox"/>	Ratas, lauchas, ratones
<input type="checkbox"/>	Gatos	<input type="checkbox"/>	Caballos
<input type="checkbox"/>	Vacas	<input type="checkbox"/>	Cabras, ovejas
<input type="checkbox"/>	Cerdos	<input type="checkbox"/>	Otro/s

28. **¿QUÉ TIENEN QUE HACER LAS PERSONAS PARA NO CONTAGIARSE LEPTOSPIROSIS?** (¿Cómo pueden prevenirla?)
(No deben leerse las opciones / Máx = 4 puntos)

<input type="checkbox"/>	No sé
<input type="checkbox"/>	Matar/Controlar ratas
<input type="checkbox"/>	Limpiar zanjas protegiéndose
<input type="checkbox"/>	Vacunándose (quimioprofilaxis)
<input type="checkbox"/>	Evitar contacto con animales enfermos
<input type="checkbox"/>	Evitar contacto con agua estancada
<input type="checkbox"/>	Evitar agua/comida contaminada
<input type="checkbox"/>	Utilizar botas/guantes
<input type="checkbox"/>	Evitar contacto con basura
<input type="checkbox"/>	Otro/s

¿Cual/es?:

29. **SI AUMENTA EL NÚMERO DE CASOS DE LEPTOSPIROSIS**

¿Ud. Podría tomar las medidas necesarias para no contagiarse?*	Sí	No sé	No	¿Porqué?
¿Tendría miedo de contagiarse?*	Sí	No sé	No	¿Porqué?
¿Confiaría en lo que dicen los medios sobre cuán grave es la situación?	Sí	No sé	No	¿Porqué?
¿Piensa que los gobiernos llegarían pronto a brindar tratamiento a las personas?	Sí	No sé	No	¿Porqué?

* Utilizadas en la construcción del score de actitudes.

30. **¿HA OIDO HABLAR DEL DENGUE?** (No: Pase a 34)

<input type="checkbox"/>	Sí	<input type="checkbox"/>	No
--------------------------	----	--------------------------	----

31. **AL COMPARAR EL DENGUE CON LA LEPTOSPIROSIS...**

	Leptospirosis	Dengue	Igual	No sé
¿Cuál le parece que es una enfermedad más grave?				
¿Cuál piensa que Ud. tiene más riesgo de contraer?				
¿Cuál le parece que afecta a una mayor cantidad de personas?				

32. **¿UD SUELE IR AL MÉDICO?**

<input type="checkbox"/>	Sí	<input type="checkbox"/>	No
--------------------------	----	--------------------------	----

33. **SI TUVIERA ALGUNOS DE ESTOS SÍNTOMAS ¿UD IRÍA AL MÉDICO? (Leer las opciones)**

Síntoma	Sí	No	Tal vez
Dolor de cabeza			
Nauseas y vómitos			
Fiebre*			
Fiebre alta (si respondió No en la anterior)*			
Malestar general (sentirse mal)			
Dificultad para respirar			
Dolor en el cuerpo (articulaciones/pantorrillas)			
Enrojecimiento de los ojos			
Sarpullido o ronchas en el cuerpo			
Si tiene 2 o más síntomas al mismo tiempo**			

* Utilizadas en la construcción del score de actitudes.

** Preguntar si respondió **No** en todos los casos anteriores.

34. **CUANDO NECESITA ATENCIÓN MÉDICA ¿A QUÉ LUGAR VA? (No deben leerse las opciones.)**

Dispensario	¿Cuál?:
Centro de salud	¿Cuál?:
Hospital	¿Cuál?:
Sanatorio/Clínica	¿Cuál?:
Otro/s	¿Cuál?:

35. **TIENE UD. ALGUNA QUEJA SOBRE EL SISTEMA DE SALUD? ¿VE ALGÚN PROBLEMA PARA RECIBIR LA ATENCIÓN MÉDICA NECESARIA?**

<input type="checkbox"/>	Sí	<input type="checkbox"/>	No
--------------------------	----	--------------------------	----

¿Cuál?:


36. **COMENTARIOS U OBSERVACIONES EN GENERAL**

LEPTOSPIROSIS

"CUIDAR NUESTRO AMBIENTE, ES CUIDAR NUESTRA SALUD"

LEPTOSPIROSIS

Una enfermedad producida por una bacteria llamada **Leptospira** que puede estar presente en la orina de ciertos animales: **perros, gatos, vacas, cerdos, caballos, ovejas, ratas, lauchas, nutrias, comadrejas, carpinchos, entre otros.**



¿Cómo se contagia?


- Por contacto directo con orina, líquidos y tejidos de animales infectados.
- Por contacto con agua, barro, o ambientes contaminados con la orina de dichos animales.

¿Cómo podemos cuidarnos?

- Evitando que los niños jueguen en el barro, charcos, cunetas y basurales.
- Usando siempre calzado (preferentemente botas de goma) al andar por lugares inundados.
- Combatiendo ratas y lauchas en las viviendas.
- Instalando potreros y gallineros lejos de la vivienda.
- Utilizando guantes y botas de goma al realizar actividades donde nos podemos contagiar, tales como: pesca, ordeño, cría o faena de animales, limpieza de zanjas y desmalezado de terrenos, siembra y cosecha, cirujeo, etc.

¿Qué hacer si nos enfermamos?

- Ir al médico cuando tenemos síntomas parecidos a los de una gripe (fiebre, dolor de cabeza, dolores musculares y malestar general).
- Contarle al médico si hemos realizado alguna de las actividades mencionadas.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Secretaría de Extensión

Proyecto de Extensión de Interés Social - Facultad de Humanidades y Ciencias.
Sociología de la enfermedad de Leptospirosis en comunidades costeras de Santa Fe

Figura S3. Folleto informativo distribuido a los participantes de la encuesta

Tabla S4. Frecuencias (%) de prácticas y situaciones de riesgos evitadas por los encuestados, según sexo (n = 113)

Actividad	Mujeres n=69	Hombres n=44	P
Pescar			<0.001
Frecuentemente	18 (26.1)	25 (56.8)	
Ocasionalmente	7 (10.1)	9 (20.5)	
Nunca	44 (63.8)	10 (22.7)	
Cazar			<0.001
Frecuentemente	3 (4.3)	11 (25.0)	
Ocasionalmente	1 (1.4)	4 (9.1)	
Nunca	65 (94.2)	29 (65.9)	
Desmalezar			0.42
Frecuentemente	27 (39.1)	20 (45.5)	
Ocasionalmente	2 (2.9)	3 (6.8)	
Nunca	40 (58.0)	21 (47.7)	
Recolectar leña			0.68
Frecuentemente	23 (33.3)	18 (40.9)	
Ocasionalmente	6 (8.7)	4 (9.1)	
Nunca	40 (58.0)	22 (50.0)	
Ir a la isla			0.001
Sí	25 (36.2)	30 (68.2)	
No	44 (63.8)	14 (31.8)	
Pernoctar en la isla			0.001
Sí	16 (23.2)	24 (54.5)	
No	53 (76.8)	20 (45.5)	
Atravesar charcos			0.18
Sí	50 (72.5)	37 (84.1)	
No	19 (27.5)	7 (15.9)	
Mojarse los pies en charcos			1.00
Sí	41 (59.4)	27 (61.4)	
No	28 (40.6)	17 (38.6)	
Usar agua del río			0.68
Sí	20 (29.0)	15 (34.1)	
No	49 (71.0)	29 (65.9)	
Nadar en el río			<0.001
Sí	19 (27.5)	28 (63.6)	
No	50 (72.5)	16 (36.4)	

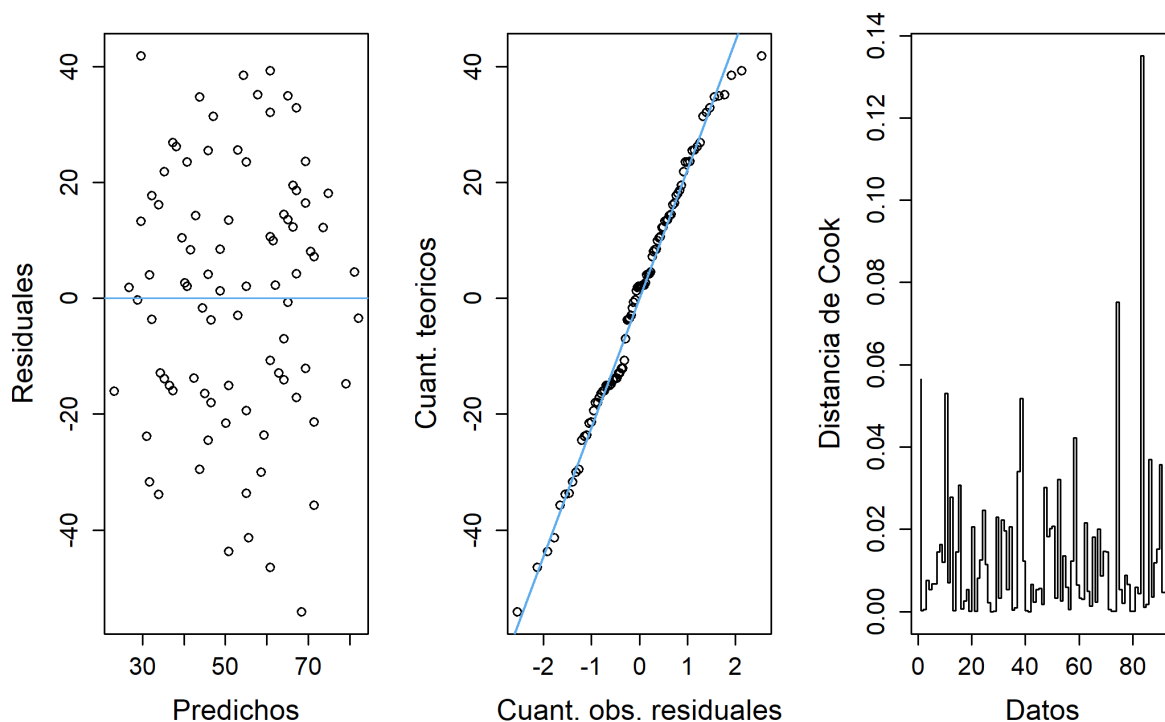


Figura S4. Análisis de residuales del modelo más parsimonioso para explicar la variación en el score de prácticas ($n = 92$)

Tabla S5. Estimación de parámetros para los coeficientes del modelo más parsimonioso del score de prácticas para la muestra completa (Modelo 1) y para mayores de 18 años (Modelo 2)

	Modelo 1	Modelo 2
Intercepto	46,48* [34,30; 58,67]	42,00* [29,94; 54,06]
Sexo: Masculino	-25,50* [-34,66; -16,35]	-25,70* [-35,29; -16,11]
Score de conocimientos	0,47* [0,17; 0,77]	0,56* [0,26; 0,87]
AIC	830.84	758.14
logLik	-410.42	-374.07
Num. obs.	92	84
Num. grupos	3	3
Var. Sitio (Intercepto)	9.88	0.00
Var. residual	481.67	484.95

* $p < 0,05$

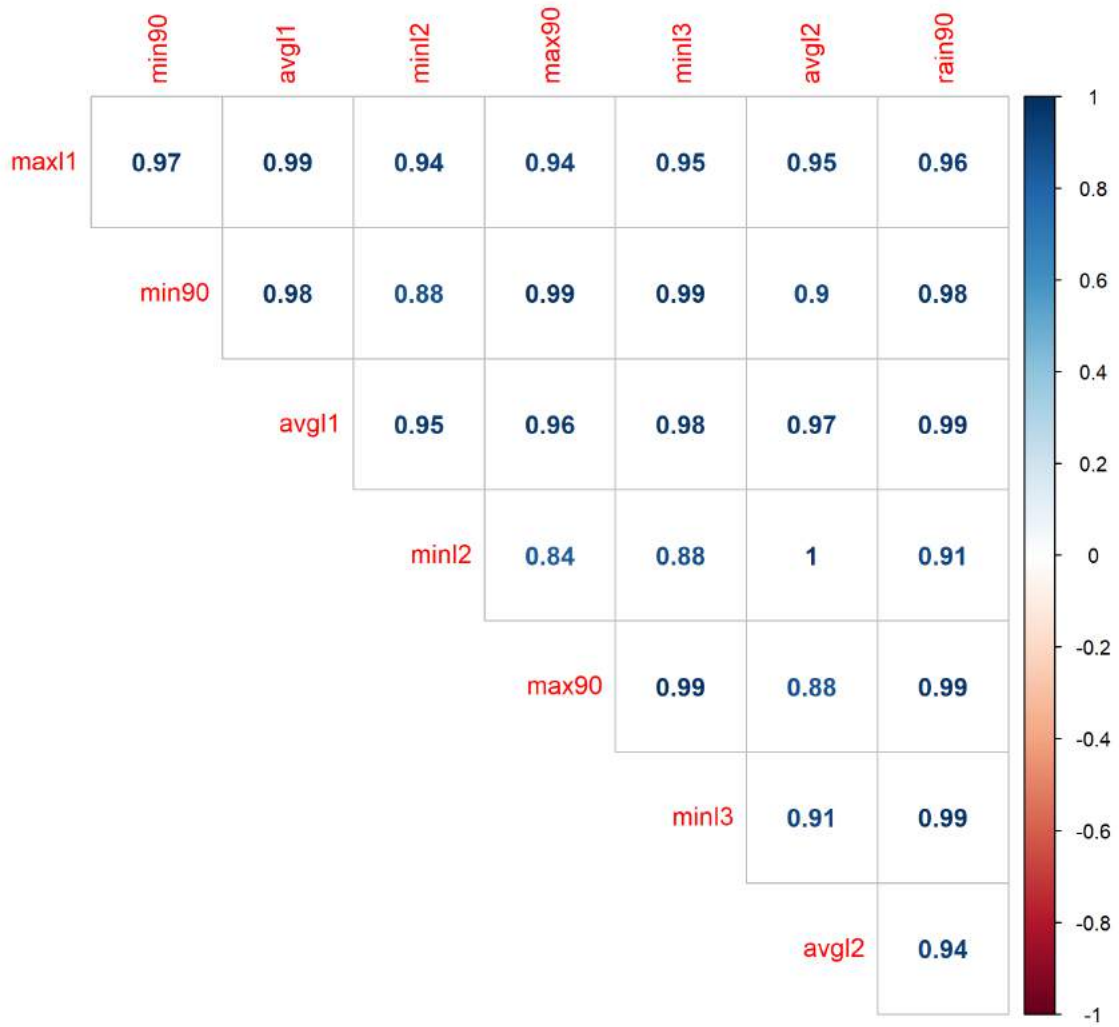


Figura S5. Correlación entre variables climáticas utilizadas en el análisis univariado para explicar seropositividad a leptospiras patógenas en roedores sigmodontinos, Santa Fe (2014-2015)

Tabla S6. Comparación de modelos multivariados para evaluar asociación entre características del roedor (especie, sexo, edad, BCS, presencia de mordeduras), variables climáticas y seropositividad en roedores (GLMM binomiales, con sitio como efecto aleatorio)

	Modelo	AICc	Δ AICc	K	Wi
	Modelo nulo	123.82	0.00	2	1.00
Temperatura máxima (promedio), lag 1		139.07	15.25	13	0.00
Temperatura mínima, 90 días		139.82	16.00	13	0.00
Temperatura media (promedio), lag 1		140.04	16.22	13	0.00
Temperatura máxima, 90 días		140.50	16.68	13	0.00
Temperatura mínima (promedio), lag 2		140.54	16.73	13	0.00
Temperatura mínima (promedio), lag 3		140.69	16.87	13	0.00
Precipitación acumulada, 90 días		140.70	16.88	13	0.00
Temperatura media (promedio), lag 2		140.80	16.98	13	0.00

AICc: criterio de información de Akaike de segundo orden;
 Δ AICc: diferencia entre el AICc del modelo candidato y el mejor modelo;
K: número de parámetros; Wi: pesos de Akaike
lag 1-3: desfase en meses

PUBLICACIONES



Primer informe de *Leptospira interrogans* en el roedor sigmodontino *Scapteromys aquaticus*

Tamara Ricardo^{1,2}, Lucas D. Monje,³ Noelia Landolt,⁴ Yosena T. Chiani,⁴
M. Fernanda Schmeling,⁴ Pablo M. Beldoménico,³ N. Bibiana Vanasco⁴ y
M. Andrea Previtali^{1,2}

Forma de citar Ricardo T, Monje L, Landolt N, Chiani Y, Schmeling MF, Beldoménico PM, et al. Primer informe de *Leptospira interrogans* en el roedor sigmodontino *Scapteromys aquaticus*. Rev Panam Salud Publica. 2018;42:e83. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2018.83>

RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial que puede transmitirse por contacto directo o indirecto con orina o tejidos de animales infectados. En Argentina, la leptospirosis es endémica en la provincia de Santa Fe y presenta brotes epidémicos durante las inundaciones. Sin embargo, se sabe muy poco sobre el papel que cumplen los roedores silvestres en la diseminación de la enfermedad en el país. El objetivo de este estudio fue identificar las especies hospedadoras de leptospirosis patógenas entre los roedores presentes en un asentamiento ribereño de la provincia de Santa Fe.

Se realizó un muestreo de roedores durante octubre de 2015. Los riñones de los animales capturados se analizaron por real-time PCR para el gen LipL32 de leptospirosis patógenas. En los animales que resultaron positivos, se realizó test de microaglutinación (MAT) y tipificación molecular por amplificación del gen 16S rRNA y dos esquemas de MLST.

Se capturaron 37 roedores de las especies *Akodon azarae*, *Cavia aperea*, *Oligoryzomys flavescens*, *Rattus rattus* y *Scapteromys aquaticus*. En el análisis por real-time PCR resultó positivo un macho de *Scapteromys aquaticus*. El suero de este individuo y del resto de los *S. aquaticus* capturados ($n = 18$) se analizaron por test de microaglutinación (MAT), y fueron no reactivos para los 10 serovares probados. La amplificación del gen 16S rRNA, identificó la especie infectante como *Leptospira interrogans*, mientras que no se obtuvo amplificación para los dos esquemas de MLST.

El hallazgo de este estudio aporta nueva información acerca de presencia de leptospirosis patógenas en roedores silvestres, que es relevante para la zona por tratarse de una especie ampliamente distribuida en ambientes pantanosos e inundables de América del Sur.

Palabras clave Leptospirosis; enfermedades transmitidas por el agua; zoonosis; reservorios de enfermedades; *Leptospira interrogans*; Argentina.

¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Santa Fe, Argentina. La correspondencia se debe dirigir a M. Andrea Previtali, andrea.previtali@gmail.com

² Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

³ Laboratorio de Ecología de Enfermedades (LecEn), Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET), UNL-CONICET, Esperanza, Santa Fe, Argentina.

⁴ Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Dr. E. Coni", Administración Nacional de

Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS "Dr. C.G. Malbran"), Santa Fe, Argentina.

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial causada por bacterias del género *Leptospira* (1, 2). Las leptospirosis se eliminan al medio ambiente por la orina de mamíferos infectados y el ser humano puede contraer la enfermedad al entrar en contacto directo o indirecto con la orina o los tejidos de estos animales (1-3).

En Argentina, el mayor factor de riesgo de la leptospirosis es el contacto persistente con ambientes inundados (1, 2, 4). La provincia de Santa Fe tiene la mayor incidencia anual de leptospirosis en el país y en ella se registran brotes epidémicos durante las inundaciones (1-5).

Actualmente se dispone de escasa información sobre el papel que desempeñan las especies de roedores silvestres como hospederas de leptospirosis patógenas en Argentina (3, 6). Por este motivo, el objetivo de este estudio fue identificar las especies hospederas de leptospirosis patógenas en los roedores presentes en un asentamiento ribereño de la provincia de Santa Fe, Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

El asentamiento estudiado pertenece a la comunidad de Los Zapallos en el límite de los Departamentos La Capital y Garay, a unos 30 km al Noreste de la ciudad de Santa Fe, capital de la provincia de Santa Fe de Argentina. Se trata de una

zona rural asentada a orillas del arroyo Leyes cuya población se dedica principalmente a la pesca, su acceso a servicios básicos es limitado y su vulnerabilidad a las inundaciones, alta.

En octubre de 2015, se realizó un muestreo de los roedores de la zona. La zona de estudio se dividió en tres sitios según su proximidad al núcleo del asentamiento: centro, borde y natural (figura 1). En cada sitio se colocaron 25 estaciones de trapeo separadas 15 m, aproximadamente, unas de otras, con una trampa tipo Sherman y una trampa tipo Tomahawk con distintos tipos de cebo por estación. Las trampas permanecieron activas durante tres días, se revisaron diariamente, se repuso el cebo y se reemplazaron las trampas con de captura.

Los animales capturados se anestesiaron por inhalación de isoflurano, se les extrajo sangre por punción cardíaca y se eutanzaron por dislocación cervical. Se determinaron la especie, los caracteres morfológicos y reproductivos y se extrajeron los órganos mediante necropsia. Los órganos y sueros obtenidos se trasladaron en un termo de nitrógeno líquido y se almacenaron hasta su procesamiento en ultrafreezer a -80°C .

El ADN genómico de cada muestra de roedor se obtuvo a partir de 0,1 – 0,2 gramos de tejido renal, utilizando el kit Promega Wizard (Promega Corporation, USA) y siguiendo el protocolo propor-

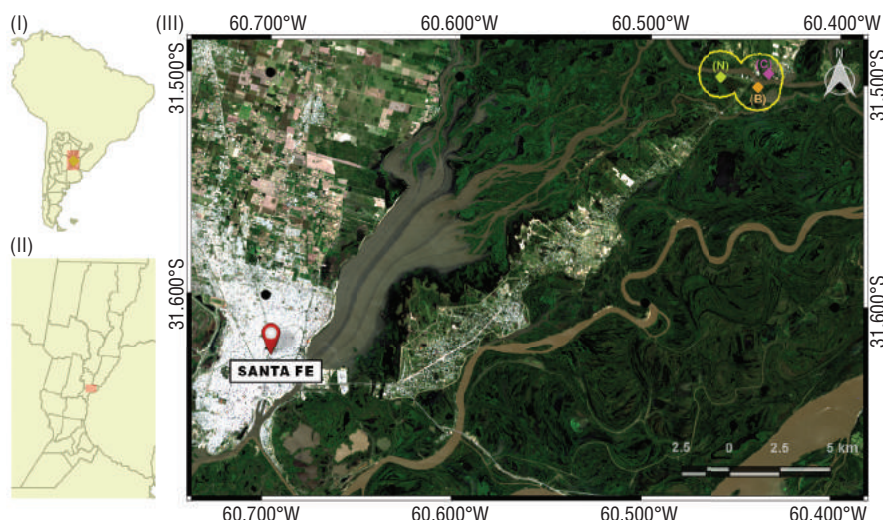
cionado por el fabricante. La pureza y la concentración del ADN genómico se determinaron utilizando un espectrofotómetro SPECTROstar Nano con MARS Data Analysis Software (BMG Labtech, Germany).

Todas las muestras se analizaron por real-time PCR con tecnología SYBR Green. Para descartar la presencia de inhibidores, se realizó una real-time PCR de secuencias de oligonucleótidos altamente conservadas en roedores utilizando los primers 18SR y 18SF (7). La detección de leptospirosis patógenas se llevó a cabo amplificando un segmento del gen *LipL32* con los primers LipL32-45F y LipL32-286R (8). El ADN de *Leptospira* se cuantificó comparando curvas de calibración, con diluciones seriadas desde 10^5 hasta 1 bacteria/ μl de control positivo en ensayos independientes.

Las real-time PCR se realizaron en un termociclador StepOne® (Applied Biosystems) con un volumen final de 20 μl por reacción, que contenía 4 μl de buffer Phire 5x, 200 μM dNTP, 0,4 pM de cada primer, 2 μl de 10x SYBR Green I (Invitrogen, USA), 150 ng de ADN y 0,4 μl de enzima Phire Hot Start II (ThermoFisher, USA). El paso inicial de la real-time PCR para *LipL32* consistió en una desnaturalización de 3 minutos a 98°C , seguida de 40 ciclos de 5 segundos a 98°C , 15 segundos a 53°C y una extensión de 20 segundos a 72°C e incluyeron un control positivo (150ng de ADN de *Leptospira interrogans* serovar Canicola cepa Hond Utrecht IV a una concentración de 10^8 bacterias/ml). La real-time PCR de la subunidad ribosómica 18S se hizo según las especificaciones de Monje, et al. (7). Todas las PCR incluyeron un control negativo de agua ultrapura. Las muestras que amplificaron antes del ciclo 40 para *LipL32* se volvieron a analizar por triplicado para descartar falsos positivos. Todos los tubos de reacción se prepararon en cabinas de bioseguridad utilizando material estéril y tips con filtro descartables. La comprobación de amplicones mediante geles de agarosa se hizo en otra sala con material descartable y equipamiento exclusivo para tal fin.

Aquellas muestras positivas para real-time PCR del gen *LipL32* se derivaron al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) donde se realizaron la tipificación molecular y el cultivo. La especie de *Leptospira* se determinó mediante amplificación de un fragmento del gen 16S *rRNA* siguiendo el protocolo descrito

FIGURA 1. Sitios de estudio: (I) localización de la provincia de Santa Fe en Argentina; (II) localización del área de estudio dentro de la provincia de Santa Fe; (III) imagen desde satélite de los sitios: (B) borde, (C) centro, (N) natural, Santa Fe, Argentina, octubre de 2015



Fuente: Capas vectoriales de Argentina y Santa Fe proporcionada por Natural Earth y el Instituto Geográfico Nacional (IGN), imagen del satélite Landsat8 proporcionada por US. Geological Survey.

por Chiani, et al. (9). El primer paso de la PCR consistió en una desnaturalización de 3 minutos a 94°C, annealing a 63°C durante 1,5 minutos y extensión durante 2 minutos a 72°C, seguido de 29 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1,5 minutos a 63°C y 2 minutos a 72°C. El último paso fue una extensión de 10 minutos a 72°C. Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa al 2%. A las muestras que amplificaron el gen *16S rRNA*, se les aplicaron dos esquemas del método Multilocus Sequence Typing (MLST) (9,10). Los productos de secuenciación de PCR *16S rRNA* y MLST se purificaron con GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) y se secuenciaron por Macrogen Inc (Seoul, Korea). Las secuencias se editaron, ensamblaron, alinearon y analizaron como indican Chiani, et al. (9).

Para realizar el cultivo, se sembraron los riñones macerados en 8 ml de medio Ellinghausen-Mc-Cullough-Johnson-Harris (EMJH) semisólido. A los cultivos originales se les realizó un repique en otro medio EMJH semisólido, para aumentar la sensibilidad de la técnica y disminuir las contaminaciones. Los cultivos se incubaron a 28°C y se observaron al microscopio de campo oscuro la primer semana y luego mensualmente durante 4 meses (11).

En aquellas especies que tuvieron animales positivos para real-time PCR, se realizó la prueba de microaglutinación (MAT) utilizando los siguientes serogrupos (cepas de referencia): *Castellonis* (Castellón 3), *Canicola* (Hond Utrecht IV), *Grippityphosa* (Moskva V), *Icterohaemorrhagiae* (M20), *Pomona* (Pomona), *Pyrogenes* (Salinem), *Tarassovi* (Perepelicin), *Sejroe* (Wolfii 3705), *Hardjo* (Hardjoprajitno) y *Hebdomadis* (Hebdomadis) (12). Los animales se consideraron reactivos a la MAT cuando presentaron títulos de anticuerpos iguales a o mayores de 1:25. El título de anticuerpos se determina

cuando se produce la aglutinación del 50% de las leptospiras libres.

Para los procedimientos empleados, se tuvieron en cuenta las sugerencias de la American Society of Mammalogists (ASM) para el uso de animales silvestres en investigación (13). A su vez, el protocolo de trabajo fue aprobado por el Comité de ética de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (Expediente 14 681).

RESULTADOS

Se capturaron 37 animales pertenecientes a las subfamilias *Sigmodontinae*, *Caviinae* y *Murinae*. La rata de pantano *Scapteromys aquaticus* representó 49% de las capturas (cuadro 1) y sólo se capturó en el sitio más cercano a las viviendas (centro).

Del total de animales capturados, se descartaron los resultados de la PCR en una muestra por haber sido negativa en el control interno *18S*. De los 36 animales restantes, solamente un macho adulto de *S. aquaticus* fue positivo a leptospiras patógenas para real-time PCR del gen *LipL32*. La muestra positiva se volvió a procesar por triplicado y se estimó una concentración de 1 leptospira/μl de ADN. Se realizó un cultivo del tejido renal sin lograr obtener ningún aislamiento de leptospiras. La especie identificada por amplificación del gen *16S rRNA* fue *Leptospira interrogans*. Se aplicaron los dos esquemas de MLST y todos los genes fueron negativos. No se obtuvieron muestras reactivas para MAT en los *S. aquaticus* capturados.

DISCUSIÓN

El hallazgo de leptospiras patógenas en riñón de *S. aquaticus* es relevante, porque no existían informes previos de infección para esta especie en toda su distribución. *Scapteromys aquaticus* se

distribuye en el oeste de Uruguay, sur de Paraguay y de Brasil, y las regiones del Chaco Húmedo, Delta e Islas del Paraná, Espinal, Esteros del Iberá y Pampeana en Argentina, y muestra preferencia por áreas pantanosas o inundables con vegetación baja (14,15).

Para la provincia de Santa Fe, sólo se habían detectado leptospiras patógenas en roedores introducidos (*Rattus* spp., *Mus musculus* y *Callosciurus erythraeus*) (3,16,17) y anticuerpos contra leptospiras en los sigmodontinos *Akodon azarae*, *Holochilus brasiliensis* y *Oligoryzomys flavescens* (3). A escala nacional, se ha notificado la presencia de leptospiras patógenas en *Rattus* spp., *M. musculus*, *A. azarae* y *O. flavescens* capturados en las provincias de Buenos Aires (6,16,17), Entre Ríos (17) y Corrientes (18).

El roedor que se encontró infectado en el presente estudio era un macho en edad reproductiva que presentaba mordeduras en las orejas, lo que concuerda con informes previos que sugieren que el comportamiento más agresivo de los roedores machos y la presencia de heridas los hace más susceptibles a la infección por leptospiras (19,20). El hecho de que la bacteria se encontrara en el tejido renal del individuo sugiere que esta especie tiene la capacidad de eliminar leptospiras patógenas al medio ambiente.

Si bien se encontró ADN de *Leptospira interrogans* en el riñón de este animal, la bacteria no se pudo aislar mediante cultivo del tejido renal. Esto podría atribuirse a que la conservación del tejido renal a -80°C haya disminuido la viabilidad de las leptospiras, lo que dificulta su crecimiento (11), y a la baja sensibilidad de la técnica (8,10,12). Asimismo, tampoco se pudieron detectar anticuerpos contra leptospiras en el suero de este animal, lo que puede deberse a que se trata de una infección reciente o a que el serogrupo de la cepa infectante no se encuentra representado en el cepario de referencia utilizado en la MAT.

Las técnicas moleculares utilizadas para la tipificación de la bacteria permitieron identificarla únicamente a nivel de especie como *Leptospira interrogans*, ya que los dos esquemas de MLST empleados fueron negativos. Esta negatividad puede deberse a la baja sensibilidad en la amplificación de los siete genes cuando las muestras de ADN no se obtienen a partir de aislamientos (9, 10).

Estos resultados preliminares no permiten saber si *S. aquaticus* es

CUADRO 1. Roedores capturados en tres sitios de estudio pertenecientes a la localidad de Los Zapallos, Santa Fe, Argentina, octubre de 2015

Especie	Borde	Centro	Natural
	No. (%)	No. (%)	No. (%)
<i>Akodon azarae</i>	4 (66,7)	0 (0)	8 (80)
<i>Cavia aperea</i>	0 (0)	2 (9,5)	0 (0)
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	2 (33,3)	0 (0)	2 (20)
<i>Rattus rattus</i>	0 (0)	1 (4,8)	0 (0)
<i>Scapteromys aquaticus</i>	0 (0)	18 (85,7)	0 (0)
Total	6 (100)	21 (100)	10 (100)

una especie reservorio de leptospiras patógenas en la zona o si son una fuente de leptospirosis importante para los pobladores de esta y otras comunidades similares. Para esclarecer su papel e investigar la dinámica temporal y espacial de las infecciones con leptospiras en este roedor, deberían realizarse estudios a largo plazo y en otros lugares de Sudamérica donde se encuentra esta especie. Además, con un mayor número de muestras de los roedores que habitan estas zonas se podrían realizar otros intentos de aislamiento de la bacteria que permitan su tipificación en serovares para poder compararlos con los que están presentes en los casos en humanos.

De todos modos, se considera que el hallazgo de este estudio contribuye notablemente a avanzar en el conocimiento de la ecoepidemiología de la leptospirosis en Argentina por tratarse del primer informe de infección por *Leptospira interrogans* de un roedor silvestre de la provincia de Santa Fe y por la escasez de informes similares en el país.

Agradecimiento. Los autores agradecen a los estudiantes de la Universidad Nacional del Litoral, Laura Bergero, Franco Abatilli, Jonatan Vega y Sofía Nóbili, su participación en los muestreos. Asimismo, agradecen al Camping Río Hermoso su apoyo y colaboración, y a los residentes de Los Zapallos que les

permitieran realizar el estudio en las inmediaciones de sus viviendas. Finalmente, agradecen a los revisores anónimos sus sugerencias, que contribuyeron a mejorar la calidad de este manuscrito.

Financiación. El presente estudio fue financiado por la Universidad Nacional del Litoral mediante el programa CAI+D Orientado 3.8 Conv. 2013: Socioecología de Leptospirosis.

Conflictos de interés. Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Declaración. Los autores son los únicos responsables de las opiniones expresadas en el manuscrito, que no necesariamente reflejan la opinión o política de la RPSP / PAJPH y / o la OPS.

REFERENCIAS

1. Ministerio de Salud. Boletín Integrado de Vigilancia. (SE19, N119.) Buenos Aires: Ministerio de Salud; 2012. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/salud/epidemiologiaysituacion> Acceso el 21 de septiembre de 2017.
- Vanasco NB, Schmeling MF, Lottersberger J, Costa F, Ko AI, Tarabla HD. Clinical characteristics and risk factors of human leptospirosis in Argentina (1999-2005). *Acta Trop*. 2008;107(3):255-8.
- Vanasco NB, Sequeira MD, Sequeira G, Tarabla HD. Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and environmental characteristics in Argentina. *Prev Vet Med*. 2003;60(3):227-35.
- Vanasco NB, Sequeira G, Dalla Fontana ML, Fusco S, Sequeira MD, Enría D. Descripción de un brote de leptospirosis en la ciudad de Santa Fe, Argentina, marzo-abril de 1998. *Rev Panam Salud Publica*. 2000;7(1):35-40.
- Vanasco NB, Fusco S, Zanuttini JC, Manattini S, Dalla Fontana ML, Pérez J, et al. Outbreak of human leptospirosis after a flood in Reconquista, Santa Fe, 1998. *Rev Argent Microbiol*. 2002;34(3):124-31.
- Lovera R, Fernández MS, Jacob J, Lucero N, Morici G, Brihuega B, et al. Intrinsic and extrinsic factors related to pathogen infection in wild small mammals in intensive milk cattle and swine production systems. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(6):e0005722-e0005722.
- Monje LD, Costa FB, Colombo VC, Labruna MB, Antoniazzi LR, Gamietea I, et al. Dynamics of Exposure to *Rickettsia parkeri* in Cattle in the Paraná River Delta, Argentina. *J Med Entomol*. 2016;53(3):660-5.
- Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;64(3):247-55.
- Chiani Y, Jacob P, Varni V, Landolt N, Schmeling MF, Pujato N, et al. Isolation and clinical sample typing of human leptospirosis cases in Argentina. *Infect Genet Evol*. 2016;37:245-51.
- Weiss S, Menezes A, Woods K, Chanthongthip A, Dittich S, Opoku-Boateng A, et al. An Extended Multilocus Sequence Typing (MLST) Scheme for Rapid Direct Typing of *Leptospira* from Clinical Samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(9):1-11.
- World Health Organization, Institutional Repository for Information Sharing. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva: WHO, IRIS; 2002.
- Vanasco NB, Vanasco NB, Lottersberger J, Lottersberger J, Sequeira MD, Sequeira MD, et al. Development and validation of an ELISA for the detection of leptospire-specific antibodies in rodents. *Vet Microbiol*. 2001;82(3):321-30.
- Sikes RS, Gannon WL. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *J Mammal*. 2011;92(1):235-53.
- Bonvicino CR, Fernandes FA a., Viana MC, Teixeira BR, D Andrea PS. *Scapteromys aquaticus* (Rodentia: Sigmodontinae) in Brazil with comments on karyotype and phylogenetics relationships. *Zoologia*. 2013;30(2):242-7.
- Barquez RM, Díaz MM, Ojeda RA. Mamíferos de Argentina: sistemática y distribución. Tucumán: Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos; 2006.
- Loffler SG, Pavan ME, Vanasco B, Samartino L, Suarez O, Auteri C, et al. Genotypes of pathogenic *Leptospira* spp isolated from rodents in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(2):163-7.
- Marder G, Ruiz RM, Bottinelli OR, Peiretti HA, Zorzo L, Merino DE, et al. Prevalencia de leptospirosis en roedores sinantrópicos de la Ciudad de Corrientes, Argentina. Período Mayo 2005-Junio 2008. *Rev Vet*. 2008;19(2):150-3.
- Gozzi AC, Guichón ML, Benitez VV, Romero GN, Auteri C, Brihuega B. First isolation of *Leptospira interrogans* from the arboreal squirrel *Callosciurus erythraeus* introduced in Argentina. *Wildlife Biol*. 2013;19(4):483-9.
- Cosson JF, Picardeau M, Mielcarek M, Tatar C, Chaval Y, Suputtamongkol Y, et al. Epidemiology of *Leptospira* Transmitted by Rodents in Southeast Asia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(6).
- Costa F, Wunder EA, de Oliveira D, Bisht V, Rodrigues G, Reis MG, et al. Patterns in *Leptospira* shedding in Norway rats (*Rattus norvegicus*) from Brazilian slum communities at high risk of disease transmission. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(6):1-14.

Manuscrito recibido el 21 de septiembre 2017. Aceptado para publicación, tras revisión, el 19 de diciembre de 2017.

ABSTRACT**First report on *Leptospira interrogans* in the sigmodontine rodent *Scapteromys aquaticus***

*Leptospirosis is a globally distributed zoonosis that can be transmitted through direct or indirect contact with the urine or tissues of infected animals. In Argentina, leptospirosis is endemic in the province of Santa Fe and epidemic outbreaks occur during floods. However, very little is known about the role that wild rodents play in the spread of the disease in Argentina. The objective of this study was to identify the host species of pathogenic *Leptospira* among rodents in a riverine settlement in the province of Santa Fe.*

*A sample of rodents was taken in October 2015. Kidneys of the captured animals were analyzed by real-time PCR for the LipL32 gene of pathogenic *Leptospira*. Animals that were positive were subjected to microscopic agglutination test (MAT) and molecular typing by amplification of the 16S rRNA gene and two multilocus sequence typing (MLST) schemes.*

*A total of 37 rodents of the species *Akodon azarae*, *Cavia aperea*, *Oligoryzomys flavescens*, *Rattus rattus*, and *Scapteromys aquaticus* were captured. Real-time PCR found one male *Scapteromys aquaticus* that was positive. The serum of this individual and of the rest of the *S. aquaticus* captured ($n = 18$) were analyzed by MAT and were non-reactive for the 10 serovars tested. Amplification of the 16S rRNA gene identified the infective species as *Leptospira interrogans*, while amplification could not be obtained for the two MLST schemes.*

*The findings of this study contribute new information concerning the presence of pathogenic *Leptospira* in wild rodents, which is relevant in this region because the species is widely distributed in swampy and flood-prone environments of South America.*

Keywords

Leptospirosis; waterborne diseases; zoonoses; disease reservoirs; *Leptospira interrogans*; Argentina.

RESUMO**Primeiro relato da presença de *Leptospira interrogans* em roedores sigmodontíneos *Scapteromys aquaticus***

A leptospirose é uma doença zoonótica de distribuição mundial transmitida pelo contato direto ou indireto com a urina ou os tecidos de animais infectados. Na Argentina, a leptospirose é endêmica na Província de Santa Fé com surtos epidêmicos ocorrendo com as enchentes. Sabe-se pouco sobre o papel dos roedores silvestres na propagação da doença no país. O objetivo deste estudo foi identificar as espécies hospedeiras de leptospirosas patogênicas em roedores encontrados em um núcleo de povoamento ribeirinho na Província de Santa Fé.

A amostragem dos roedores foi feita no mês de outubro de 2015. Os tecidos dos rins dos animais capturados foram analisados com a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-RT) quanto à presença do gene LipL32 de leptospirosas patogênicas. Para os animais com resultados positivos, foi realizado o teste de microaglutinação (MAT) e tipagem molecular baseada na amplificação do gene 16S rRNA e dois esquemas de tipagem por sequenciamento de locos múltiplos (MLST).

*Ao todo, foram capturados 37 roedores das espécies *Akodon azarae*, *Cavia aperea*, *Oligoryzomys flavescens*, *Rattus* e *Scapteromys aquaticus*. O ensaio de PCR-RT foi positivo em um roedor macho da espécie *Scapteromys aquaticus*. Os soros deste animal e dos outros *S. aquaticus* capturados ($n = 18$) foram analisados com o MAT e os resultados foram não reagentes para os 10 sorovares testados. A amplificação do gene 16S rRNA permitiu identificar a espécie infetante como sendo *Leptospira interrogans* e não houve amplificação nos dois esquemas de MLST.*

O achado deste estudo fornece um novo dado quanto à presença de leptospirosas patogênicas em roedores silvestres, importante para esta área por se tratar de uma espécie de ampla distribuição em terras pantanosas e inundáveis da América do Sul.

Palavras chave

Leptospirose; doenças transmitidas pela água; zoonoses; reservatórios de doenças; *Leptospira interrogans*; Argentina.

RESEARCH ARTICLE

Knowledge, attitudes and practices (KAP) regarding leptospirosis among residents of riverside settlements of Santa Fe, Argentina

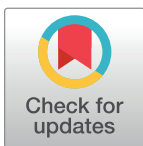
Tamara Ricardo^{1,2}*, Laura C. Bergero^{2‡}, Esteban P. Bulgarella^{3‡}, M. Andrea Previtali^{1,2}✉*

1 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Santa Fe, Santa Fe, Argentina, **2** Departamento de Ciencias Naturales/ Facultad de Humanidades y Ciencias/ Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Santa Fe, Argentina, **3** Observatorio Social/ Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Santa Fe, Argentina

✉ These authors contributed equally to this work.

‡ These authors also contributed equally to this work.

* andrea.previtali@gmail.com (MAP); tricarado@fhuc.unl.edu.ar (TR)



OPEN ACCESS

Citation: Ricardo T, Bergero LC, Bulgarella EP, Previtali MA (2018) Knowledge, attitudes and practices (KAP) regarding leptospirosis among residents of riverside settlements of Santa Fe, Argentina. *PLoS Negl Trop Dis* 12(5): e0006470. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006470>

Editor: Sergio Recuenco, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, PERU

Received: December 20, 2017

Accepted: April 20, 2018

Published: May 7, 2018

Copyright: © 2018 Ricardo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All database spreadsheet and R script files are available from the Opendatabase (accession number(s) osf.io/9ajhx).

Funding: Funding was provided by the Universidad Nacional del Litoral, projects coded: CAI+D orientado 3.8 and 2013-49-PEIS-FHUC-PM. Funding also was provided by the Secretaría de Estado de Ciencia, Tecnología e Innovación of Santa Fe province (SECTel 2010-105-12). TR is a doctoral fellow of the National Council for Scientific

Abstract

Background

Leptospirosis is a global and re-emerging zoonotic disease caused by *Leptospira* spirochetes that are shed into the environment by infected animals. Humans can get infected via contact with animal hosts or contaminated environment. In Argentina, the highest annual incidences were reported in the province of Santa Fe, where epidemic outbreaks occurred during flooding events. This study examined the knowledge, attitudes and practices (KAP) regarding leptospirosis among residents of riverside slum settlements from Santa Fe after a major flood.

Methods and findings

A cross-sectional questionnaire was administered to 113 residents of 3 riverside settlements from Santa Fe. The influence of knowledge and attitudes regarding leptospirosis on the likelihood that an individual will use preventive practices were evaluated using linear mixed-effects models. The majority of respondents (83.2%) had previously heard about leptospirosis; however specific knowledge about leptospirosis was limited. The results of the modeling efforts, show that the likelihood of using preventive practices was associated with having greater knowledge score, but not with more positive attitudes. We also found that females were more likely to use safer practices than males.

Conclusions

Even though the majority of respondents had heard about leptospirosis, a high percentage of them had limited knowledge regarding the severity of the disease and its prevalence in the region. Our results suggest that public health interventions in these riverside communities should focus on educating the public on the multiple dimensions of leptospirosis in order to attain greater adherence to preventive practices instead of intending to change the

and Technological Investigations (CONICET) and MAP is a research scientist from CONICET. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

perceptions or attitudes towards the disease, which did not have a significant influence. The key challenge lies in identifying effective strategies to reach the high risk group for leptospirosis here that is male fishermen, who spend most of the time in precarious campsites on the river islands.

Author summary

Leptospirosis is a zoonotic bacterial disease that has been recognized as a growing public health problem affecting mainly residents from slum settlements located in floodable areas. As such, it is considered a neglected disease that needs greater attention to reduce its global burden. A key step towards this purpose is to identify factors that influence the adherence to preventive practices regarding leptospirosis in endemic areas. We conducted a survey on residents of riverside settlements of the province of Santa Fe, an endemic area in Argentina, in order to evaluate the knowledge, attitudes and practices regarding leptospirosis. Our results suggest that risky practices were performed mainly by men and that, contrary to our expectations, having a positive attitude towards leptospirosis does not appear to influence the likelihood of performing preventive practices, while greater knowledge about the disease does lead to safer practices. Public health officials should develop a comprehensive plan with diverse information, education and communication activities to promote a better understanding of the symptoms, treatment and prevention of leptospirosis by the various actors involved.

Introduction

Leptospirosis is a zoonotic disease caused by *Leptospira* spirochetes. Pathogenic leptospires are excreted in the urine of mammalian hosts such as rodents, dogs and cattle and can persist in the environment for weeks or months [1–4]. Humans serve as incidental hosts, exposure may occur through direct contact with infected animal urine and tissues, or indirect contact with contaminated soil and water [1, 4, 5].

The contact with environmental sources of leptospires in urban and rural slum settlements can be increased by lack of basic sanitation, poor housing, crowding and extended time outdoors, together with heavy rainfall and flooding [6–12]. Furthermore, slum residents often engage in informal work such as small-scale construction, subsistence hunting or fishing, and food preparation for vending in the same areas where they reside [1, 2, 7, 10] or maintain subsistence livestock and chickens in their backyards [2, 4, 7, 8, 11], increasing the risk of environmental exposure.

Every year, between 500,000 and 1.03 million cases of leptospirosis are reported in the world, with a mortality rate over 10% [1, 13]. However, the global burden of leptospirosis is thought to be underestimated by several factors, including the broad clinical spectrum of the disease that mimics many other endemic infectious diseases such as dengue and malaria [1, 13–15]. Additionally, many countries lack a case notification system or notification is not mandatory [1, 16, 17].

Latin America is one of the regions with the highest number of cases of leptospirosis in the world [14, 16], having reported 10,088 cases in 2014 of which 40.2% belonged to Brasil, followed by Perú, Colombia and Ecuador [16]. Even though Argentina reported 217 laboratory confirmed cases in 2014 [16], between 2005 and 2017, 14,319 suspected cases were reported to

the National Health Surveillance System (SNVS) [18–23], being one of the leading countries in alerts of cases in Latin America [16].

The main risk factor for leptospirosis in Argentina is the persistent contact with flooded environments [8, 23–26]. Floodings may lead to disruption of health services and damage to households and water and sanitation networks, displacing populations and increasing the risk of exposure to rats and pathogens [2, 15].

The first case of leptospirosis in Argentina, was reported in the province of Santa Fe in 1915 [27]. Leptospirosis is considered an emerging public health problem in the country, and notification of suspected cases is mandatory [8, 23, 26]. The highest annual incidence rates of leptospirosis in Argentina occur in the province of Santa Fe [23, 26, 28], representing 46.4% of reported cases and 38% of confirmed cases in the country for the period 2012–2017 [18–22], with outbreaks registered following flooding events [23–26, 29, 30]. The number of severe cases of leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage has increased in recent years [8, 26, 28].

Assessments of people’s knowledge of leptospirosis and health behavior provide critical information for disease prevention [9, 31–35]. In particular, surveys of knowledge, attitudes and practices (KAP) are useful public health tools to identify effective strategies for behavior change towards safer practices [32, 33, 36, 37]. Despite this, leptospirosis remains a neglected disease in Argentina and no studies have been conducted to assess the level of public awareness about the disease. The objectives of this study were to describe the knowledge, attitudes and practices regarding leptospirosis in riverside slum settlements from Santa Fe affected by a flood event and to evaluate the factors influencing preventive practices.

Materials and methods

Study location and population

The city of Santa Fe (31° 38’0’’S, 60° 42’0’’W) with a population of 391,231 in 2010 [38], is the capital of Santa Fe province, located in north-eastern Argentina in the junction of the Paraná and Salado rivers. Study sites comprised two riverside neighborhoods of Santa Fe and a settlement 30 km NE from the city. All three sites were located in the flood valley of the Paraná river, an area with high susceptibility to floods and different levels of deficiency in sanitary infrastructure.

A map was constructed to show how the landscape changed during the flood event (Fig 1) using QGIS 3.0 Girona [39] with the Semiautomatic Classification Plugin [40]. The base map and the raster layers of water bodies, before and during the flood event, were created from Landsat8 OLI/TIRS satellite imagery acquired from U.S. Geological Survey (<https://ers.cr.usgs.gov>). Vector layers were acquired from Natural Earth (<http://www.naturalearthdata.com>).

Site 1 corresponds to the neighborhood called La Vuelta del Paraguayo, located on the banks of the Santa Fe stream (Fig 1) with about 408 residents distributed in 64 households [41]. This site has water supply services and electricity but has no sewers, health centers, paved streets or public transportation [42]. Site 2 corresponds to Colastiné Sur, a riverside neighborhood located on the banks of the Colastiné river (Fig 1) with approximately 1018 residents distributed in 308 households [41]. This site has electricity, a health center, refuse recollection and public transportation but has no sewers, water supply services or paved streets [43]. Site 3 corresponds to a sector of the locality of Los Zapallos, this sector is located at the banks of the Leyes stream, 30 km NE of the city of Santa Fe (Fig 1). It consists of approximately 564 residents from 92 households. This site has electricity, water supply services, refuse recollection and a nearby health center (approximately at 1.5 km) but it does not have sewers or paved roads (Data obtained from the commune of Santa Rosa de Calchines).

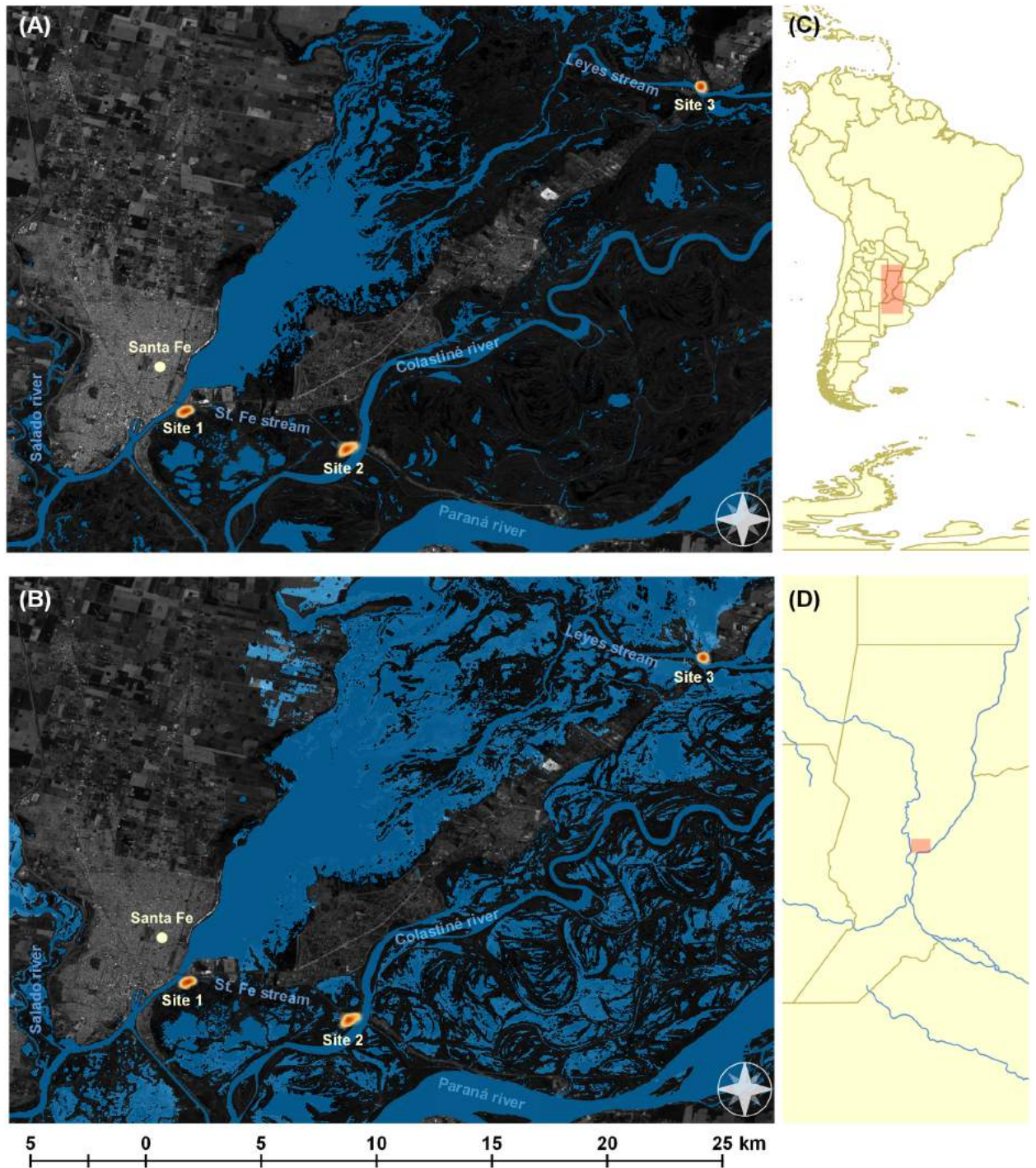


Fig 1. Flood map of the locations where the questionnaire was implemented. (A) Before the flood event; (B) During the flood event; (C) Location of the province of Santa Fe in Argentina; (D) Location of the study area in the province of Santa Fe. Accessible areas of study sites are overlaid as heat map where darker shades of orange indicate higher concentration of sampling units. Map generated with QGIS Geographic Information System. Satellite imagery was downloaded from Landsat8 OLI/TIRS downloaded from U.S. Geological Survey at: <https://ers.cr.usgs.gov/>. Vector layers were downloaded from Natural Earth at: <http://www.naturalearthdata.com/>.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006470.g001>

Data collection tools

Between March and May of 2016 we conducted a cross-sectional study assessing leptospirosis related KAP. Data was collected after a major flood event of the Paraná river that affected all study sites (Figs 1 and 2). Questionnaire participants were selected using a census sweep technique which allowed the sampling of both evacuated and non-evacuated households. Census sweeping was chosen as the sampling method to cover these small and clumped resident areas. We tried to minimize the potential influence of our presence on future questionnaire responses by conducting the census in the minimum number of days possible and following a particular direction for the sweeping design.

At each visit to the study sites, interviewer-administered questionnaires were used to gather necessary information from one resident per household. Similar to other published KAP studies, the questionnaire was conducted on residents who were at least 12 years old [9, 34, 35, 44, 45]. Residents were informed about the aspects of the research and a verbal consent was obtained from those willing to answer the questionnaire. Anonymity of the respondents and confidentiality of the data obtained were respected. Approval to conduct the survey was obtained from the local government units of Santa Fe and the Ethics committee of the Universidad Nacional del Litoral (CAID orientado 2013: “Socioecología de Leptospirosis”).

The questionnaire had been pre-tested in communities neighboring the study areas. The questionnaire consisted in 36 questions which included demographic factors such as age, sex, level of education attained, occupation and evacuation status. The questionnaire also included questions to assess the respondent’s KAP regarding leptospirosis (S1 Table). After the completion of the survey, an informative flier with most common symptoms of leptospirosis, modes of transmission and preventive actions was given and explained to each respondent (S1 Fig).

KAP scores

Computation of practice scores was based on 8 items from the questionnaire (S1 Table: 2-7, 9, 11) ranging from a minimum of 0 points to a maximum of 14 points. A low score indicated risky behaviors or habits, while a high score was indicative of safer practices. Frequency of activities such as fishing, hunting and handling livestock, gathering firewood and gardening were categorized in: frequently (at least once a week), rarely (less than once a month) or never and were given a score from 0 to 2 respectively. Performing the above activities barefooted subtracted 2 points to the practice scores, while using footwear that is not water-proofed subtracted 1 point and using boots or waders did not subtract points. An extra point was added to the practice scores when the person indicated avoiding situations that are thought to increase transmission risk, such as going to the river islands, spending the night on the islands, walking barefooted through flood water or using river water for consumption or to clean or swim.

The computation of knowledge and attitude scores was restricted to those respondents who reported having heard about leptospirosis. Knowledge score increased as the person knew more about the disease. It was based on 7 items from the questionnaire (S1 Table: 14, 23-28) covering general aspects of leptospirosis, including knowledge on symptoms, transmission and preventive actions with a minimum of 0 and a maximum of 22 points. We included open-ended questions that allowed multiple answers and were scored as the sum of correct minus the incorrect answers. We also included closed-ended questions that were scored as 1 if the answer was “Yes” and 0 if the answer was “No/Does not know” being “Yes” the correct answer.

Attitude scores increased as the person responding the questionnaire communicated greater awareness of the risk and/or a greater tendency to act if symptoms appear or during an outbreak. Attitude scores were based on 7 items from the questionnaire (S1 Table: 16-17,



Fig 2. Study sites at the time of the questionnaire. (A) Children playing in a small dump-yard outside the evacuation center of Site 1; (B) Flooded household from Site 2; (C) Self-evacuated residents from Site 3.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006470.g002>

29-33) with a minimum of 0 and a maximum of 13 points, and included questions regarding perceptions of leptospirosis prevalence in the area and reactions to a potential leptospirosis outbreak that were scored from 0 to 2; questions regarding the perceived risk of leptospirosis in comparison to dengue, and the propensity of seeking medical attention in case of febrile symptoms were scored from 0 to 1. The crude scores for knowledge, attitudes, and practices were expressed as percentages dividing by the maximum score possible for each category and multiplying by 100.

Data analyses

Data was entered using Microsoft Access, then cleaned and analyzed with R software version 3.4.1 [46]. Results were presented as frequency (%) for categorical variables and as mean \pm standard deviation (SD) or median (IQR) for KAP scores. To compare KAP scores between sites we used analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post comparison tests or Kruskal-Wallis ANOVA followed by Dunn's posts comparison tests to assess if there were differences between sites. The level of statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

The factors associated with practice scores were evaluated using linear mixed-effects models (LMM) with site as random intercept, using the *lme4* package [47]. Respondents who reported hearing about leptospirosis and had no missing data on socio-demographic characteristics were included in the analysis. A list of candidate models was obtained using a manual step-backward procedure from a full model based on the Kenward-Roger approach, using the *pbkrtest* package [48]. The full model included the respondent's sex, age, education attained, a dummy variable coded as 1 if the respondent worked outside of his/her home and 0 if not, a dummy variable coded as 1 if the respondent used media (television, radio, internet, newspaper) as source of health information or 0 if not, a dummy variable coded as 1 if the respondent used health services as source of health information and 0 if not, a dummy variable coded as 1 if the respondent knew someone that had leptospirosis and 0 if not, plus the respondent's knowledge score and attitudes score. Models were then compared using second-order Akaike Information Criteria (AICc) [49] with the *MuMIn* package [50]. Inferences were derived from the most parsimonious model among the candidate models with a $\Delta AICc < 4$, and was refitted by Restricted Maximum Likelihood (REML) in order to obtain coefficient estimates for the random and fixed effects parameters.

Results

Socio-demographic characteristics

A total of 113 persons from the three study sites responded the survey, representing both evacuated (62.8%) and non-evacuated (37.2%) households (Table 1). The majority of the respondents (61.1%) were female and had primary school as the highest level of education attained (65.5%; Table 1). The ages of the respondents ranged from 12 to 77 years old with a median of 37 years old (IQR: 27-52).

Housewives, unemployed, retired and students represented 58.4% of the respondents. Of the respondents who worked outside of their home, 15.9% were subsistence fishermen, 5.3% worked in small-scale construction and 20.4% were engaged in other activities such as working at small retail business, domestic services and municipal employment (Table 1).

Knowledge, attitudes and practices

Ninety four (83.2%) respondents reported having previously heard of leptospirosis, and almost half of them (47.9%) knew at least one person who had the disease. The majority of

Table 1. Frequencies (%) of socio-demographic characteristics and evacuation status of the respondents (n = 113).

Variable	Site 1 n = 26	Site 2 n = 46	Site 3 n = 41	Overall n = 113
Sex				
Female	15 (57.7)	27 (58.7)	27 (65.9)	69 (61.1)
Male	11 (42.3)	19 (41.3)	14 (34.1)	44 (38.9)
Age group (years)				
<18	1 (3.8)	5 (10.9)	5 (12.5)	11 (9.8)
18-29	3 (11.5)	9 (19.6)	8 (20.0)	20 (17.9)
30-44	10 (38.5)	15 (32.6)	11 (27.5)	36 (32.1)
45-64	8 (30.8)	13 (28.3)	13 (32.5)	34 (30.4)
≥65	4 (15.4)	4 (8.7)	3 (7.5)	11 (9.8)
Education attained				
Illiterate/Incomplete primary school	5 (19.2)	5 (10.9)	11 (26.8)	21 (18.6)
Primary school	18 (69.2)	31 (67.4)	25 (61.0)	74 (65.5)
High school	3 (11.5)	10 (21.7)	3 (7.3)	16 (14.2)
Data Missing	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (4.9)	2 (1.8)
Occupation				
Employed	6 (23.1)	12 (26.1)	5 (12.2)	23 (20.4)
Builder	1 (3.8)	4 (8.7)	1 (2.4)	6 (5.3)
Fisherman	3 (11.5)	4 (8.7)	11 (26.8)	18 (15.9)
Student	1 (3.8)	5 (10.9)	7 (17.1)	13 (11.5)
Housewife/Unemployed/Retired	15 (57.7)	21 (45.7)	15 (36.6)	51 (45.1)
Data Missing	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (4.9)	2 (1.8)
Evacuee				
No	1 (3.8)	22 (47.8)	19 (46.3)	42 (37.2)
Yes	25 (96.2)	24 (52.2)	22 (53.7)	71 (62.8)

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006470.t001>

respondents who had heard about leptospirosis identified it as a disease associated with rats (71.3%) and were aware that leptospirosis has a cure (72.3%) but it can be fatal (80.9%). The symptoms of leptospirosis that were frequently identified included fever (55.3%) and headache (26.6%) (Fig 3A). Almost a third of the respondents (29.8%) were not able to describe a mode of transmission. Of those who responded the question about transmission, the majority identified rats and mice as the main animal hosts (79.8%) and the urine of these animals as the main mode of transmission (46.8%) (Fig 3B and 3C). When asked about preventive actions, 36.2% of the respondents were unable to mention a preventive action and only 5.3% mentioned avoiding contact with flood water (Fig 3D). Overall mean knowledge score was 33.9% (SD ±15.9%), ANOVA test yielded significant differences among site ($P < 0.001$), with Site 1 (42.6%, SD ±14.6) and Site 2 (37.5%, ±13.3%) having significantly higher scores than Site 3 (22.3%, ±13.5%).

When asked about where they have heard about leptospirosis, almost half of the respondents (48.9%) reported using the media (television, radio, newspapers, internet) as their source of information, followed by health services (36.2%), relatives and neighbors (29.8%) and schools (14.9%).

Regarding the attitudes about leptospirosis, 52 (55.3%) respondents believed that there are few cases per year but 57 (60.6%) assumed that there could be an epidemic outbreak (Table 2). When asked how they would act in the face of a possible outbreak, 53 (56.4%) respondents said they would be afraid of becoming infected and 80 (85.1%) said they would be able to take

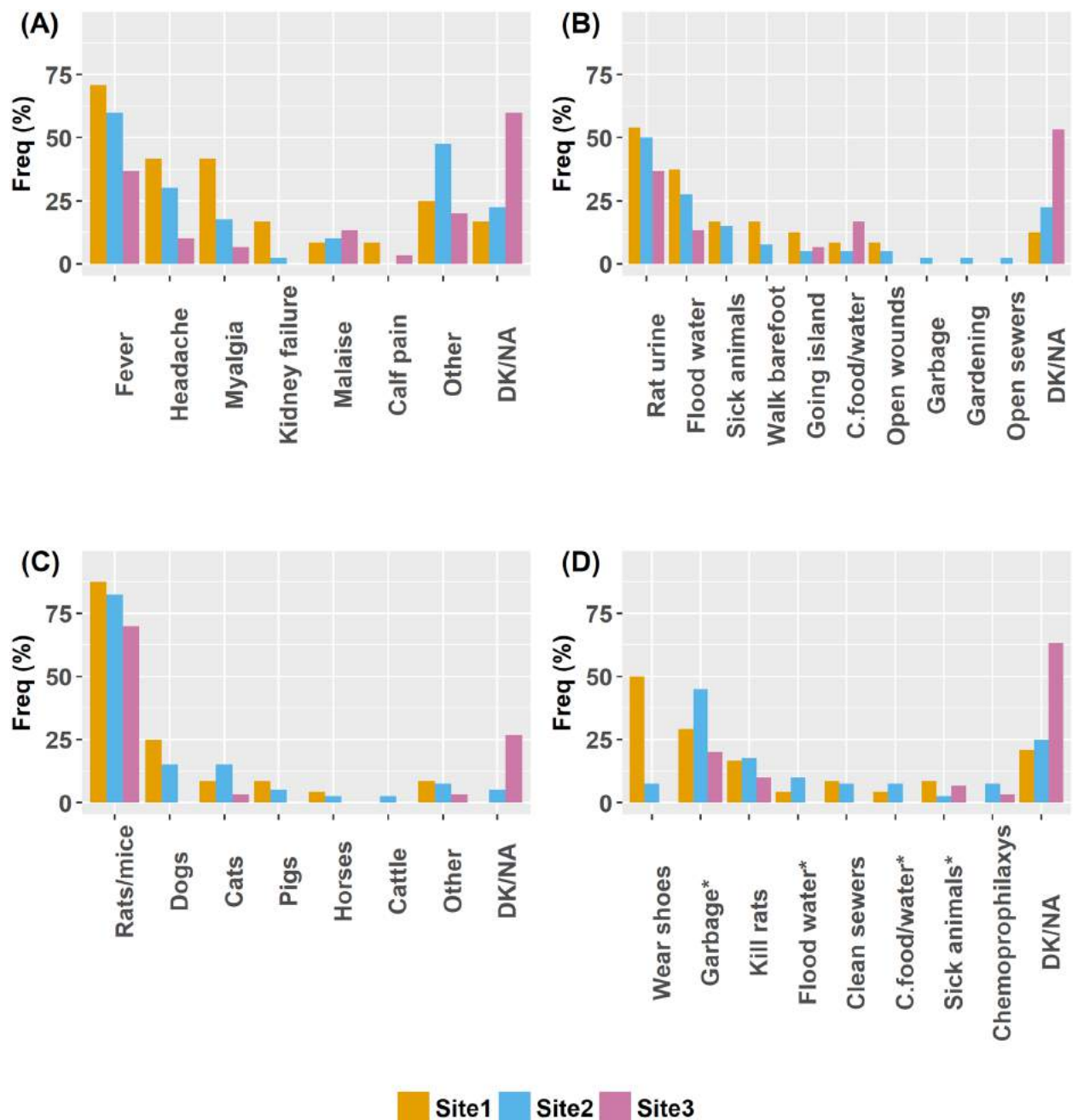


Fig 3. Knowledge about leptospirosis among respondents from three riverside settlements (n = 94). (A) Leptospirosis symptoms reported; (B) Environmental modes of transmission identified; (C) Suspected animal hosts mentioned; (D) Preventive measures mentioned. C.: Contaminated; *Avoidance of.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006470.g003>

preventive measures. The majority of respondents considered that dengue is more prevalent than leptospirosis in the area (59.6%), yet there was not a notable distinction on how they perceived their risk to these diseases, approximately a third of the respondents felt more at risk of leptospirosis, a third more at risk of contracting dengue, and a third felt equally at risk to both diseases (Table 2). While 55.3% of the respondents considered dengue to be a more severe

Table 2. Frequencies (%) of attitudes towards leptospirosis among respondents that heard about leptospirosis (n = 94).

Variable	Site 1 n = 24	Site 2 n = 40	Site 3 n = 30	Overall n = 94
How many cases are reported yearly?				
Large number of cases	9 (37.5)	13 (32.5)	2 (6.7)	24 (25.5)
Few cases	9 (37.5)	22 (55.0)	21 (70.0)	52 (55.3)
Do not know	6 (25.0)	5 (12.5)	7 (23.3)	18 (19.1)
Could there be an outbreak?				
Yes	21 (87.5)	22 (55.0)	14 (46.7)	57 (60.6)
No	2 (8.3)	11 (27.5)	7 (23.3)	20 (21.3)
Not sure	1 (4.2)	7 (17.5)	9 (30.0)	17 (18.1)
Which is more prevalent?				
Leptospirosis	5 (20.8)	6 (15.0)	2 (6.7)	13 (13.8)
Dengue	8 (33.3)	27 (67.5)	21 (70.0)	56 (59.6)
Same	4 (16.7)	3 (7.5)	3 (10.0)	10 (10.6)
Do not know	7 (29.2)	4 (10.0)	4 (13.3)	15 (16.0)
Which are you more exposed to?				
Leptospirosis	8 (33.3)	12 (30.0)	8 (26.7)	28 (29.8)
Dengue	10 (41.7)	13 (32.5)	7 (23.3)	30 (31.9)
Same	5 (20.8)	12 (30.0)	7 (23.3)	24 (25.5)
Do not know	1 (4.2)	3 (7.5)	8 (26.7)	12 (12.8)
Which is a more severe disease?				
Leptospirosis	6 (25.0)	7 (17.5)	6 (20.0)	19 (20.2)
Dengue	13 (54.2)	23 (57.5)	16 (53.3)	52 (55.3)
Same	4 (16.7)	7 (17.5)	5 (16.7)	16 (17.0)
Do not know	1 (4.2)	3 (7.5)	3 (10.0)	7 (7.4)

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006470.t002>

disease than leptospirosis, 17% of the respondents considered them equally severe (Table 2). Of the 94 respondents, 16% were not able to respond the question regarding how prevalent they think these diseases are in the area, 12.8% were not able to respond to which of the two they felt more at risk and 7.4% were not able to respond the question about the severity of leptospirosis and dengue (Table 2). On the other hand, we found that the majority of the respondents usually seek medical care (77%), and when asked if they would seek it in case of persistent fever 96.4% gave an affirmative answer. Overall median attitudes score was 76.9% (IQR 30.8-100%) and Kruskal-Wallis ANOVA yielded no significant differences between sites (P = 0.26).

For preventive practices, 54 (48.7%) out of 113 respondents reported never going fishing, 94 (83.2%) reported never going hunting or handling livestock, 61 (64%) reported never doing gardening and 62 (54.9%) reported never collecting firewood. Differences between genders were observed in the frequencies of fishing and hunting (S2 Table). Of those respondents that reported performing one or more of those activities (n = 85), 44 (51.8%) wore inappropriate footwear, 36 (42.4%) wore boots or wading suits and 5 (5.9%) went barefooted. With regard of avoidance of risk practices, 58 (51.3%) respondents reported not going to the river islands, 73 (64.6%) reported not spending the night at the island, 26 (23%) reported avoiding to walk through flood water, 45 (39.8%) reported avoiding to get their feet wet on flood water, 78 (69%) reported to avoid the use of water from the river or flood water to drink or clean and 66 (58.4%) avoided to swim in the river or flood water (Fig 4). Differences between genders were observed in the avoidance of some risk situations (Fig 4; S2 Table). Overall median practices

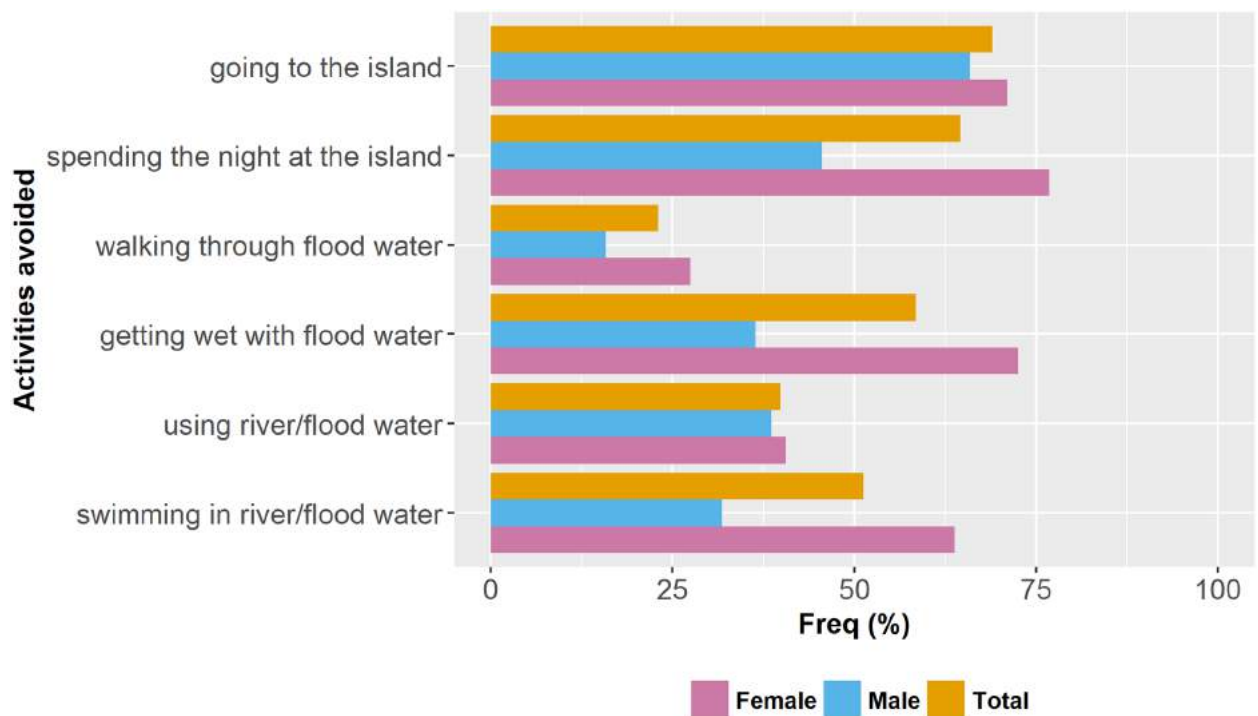


Fig 4. Avoidance of risky practices among male and female respondents (n = 113).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006470.g004>

score was 57.1% (IQR 0-100%) and Kruskal-Wallis ANOVA yielded no significant differences between sites ($P = 0.08$).

Factors affecting leptospirosis preventive practices

The adherence to leptospirosis preventive practices was assessed by modeling practices score as a function of 9 independent variables: sex, age, education and occupational status of the respondent, whether the respondent uses media as source of leptospirosis information, whether the respondent uses health services as source of leptospirosis information, whether the respondent knows someone that has had leptospirosis, knowledge score and attitudes score. Manual step-backward procedure yielded a list of 10 models, from which the most parsimonious model was selected (Table 3).

In the final model, practices score was negatively associated with male sex and positively associated with knowledge score (Table 4). In this model, fixed effects alone explained 28.43% of the variation while both fixed and random effects explained 29.87% of the variation (Table 4), residuals were normally distributed with a mild outlier.

Discussion

To our knowledge, this is the first study that aimed at describing the knowledge, attitudes and preventive practices associated with leptospirosis in Argentina. Our study, conducted on riverside settlements of the province of Santa Fe, provides relevant information on the risk of leptospirosis among communities from an endemic area highly vulnerable to floods [23–25, 28–30]. The majority of the respondents in this study had heard about leptospirosis (83.2%), however, many of them were not able to describe leptospirosis symptoms (33%), nor modes of

Table 3. Candidate linear mixed-effects models to explain variability on practices score using site as random intercept (n = 92).

Model	K	AICc	Δi	Wi	logLik
<i>sex + health.center + knowledge</i>	6	837.50	0.00	0.35	-412.26
<i>sex + knowledge</i>	5	838.12	0.62	0.26	-413.71
<i>sex + media + health.center + knowledge</i>	7	838.60	1.10	0.20	-411.63
<i>sex + employed + media + health.center + knowledge</i>	8	839.77	2.26	0.11	-411.02
<i>sex + employed + media + knowsSO + knowledge</i>	9	841.34	3.83	0.05	-410.57
<i>sex</i>	4	844.30	6.79	0.01	-417.92
<i>sex + education + employed + media + health.center + knowsSO + knowledge</i>	11	844.79	7.28	0.01	-409.74
<i>sex + education + employed + media + health.center + knowsSO + knowledge + attitudes</i>	12	846.89	9.39	0.00	-409.47
<i>sex + age + education + employed + media + health.center + knowsSO + knowledge + attitudes</i>	13	849.16	11.66	0.00	-409.25
<i>null</i>	3	865.21	27.70	0.00	-429.47

K: Number of effective parameters; **AICc:** Akaike’s bias-adjusted information criteria; **Δi:** differences in AICc between the candidate model and the best model; **Wi:** Akaike weights; **logLik:** log-Likelihood.

KnowsSO: whether the respondent knows someone that had leptospirosis

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006470.t003>

transmission (29.8%) or preventive actions (36.2%). In order for people in these communities to be better prepared to avoid infection or disease progression it is critical to increase the knowledge on these key aspects as previously suggested in studies from Chile [51], Philippines [32], Trinidad [35], Malaysia [33, 37] and Sri Lanka [44].

In terms of recognizing leptospirosis risk factors, only 25.5% of the respondents mentioned contact with flood water as a mode of transmission. Given that this is considered the main mode of transmission in the region [23–26], it is concerning to find that only a small proportion of the population is aware of this risk. These communities do not have paved roads and most of them have open sewers, commonly known as “zanjas”, that contain stagnant water most of the time. After large rainfall events, dirt roads are filled with puddles and rainfall is mixed with water from the open sewers and/or ponds. In the three study communities it is a common practice to cross these puddles barefooted (60.2%) which increases transmission risk.

Table 4. Parameter estimations for the coefficients of the most parsimonious model for practices score (n = 92).

Estimate	Coefficient (95% CI)
Intercept	46.48* (34.30; 58.67)
Sex: Male	- 25.50* (-34.66; -16.35)
Knowledge score	0.47* (0.17; 0.77)
AIC	830.84
logLik	-410.42
Nom. obs	92
Num. groups	3
Var. Site (Intercept)	9.88
Var. Residual	481.67
R ² (m)	28.43%
R ² (c)	29.87%

**p* < 0.05; R²(m): marginal R-squared; R²(c): conditional R-squared.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006470.t004>

Many respondents work in the informal sector, mainly in outdoor activities such as fishing, hunting and gardening, half of them did not use adequate footwear. Other studies have found that protective gear is often not used due to difficulty in acquiring it or because people feel that it is uncomfortable [9, 34, 44]. In our study communities, the use of adequate footwear may increase with a greater awareness that leptospirosis can be acquired through contact with contaminated water.

In this region, leptospirosis is also called “the disease of the rats” as most people consider that rats play an important role in disease transmission. In our study, 79.8% of the respondents mentioned rats as the source of leptospirosis to humans. In agreement with other studies [33, 44, 52], only a low percentage of respondents recognized dogs (12.8%) and cattle/pigs (5.4%) as animal sources of leptospirosis. This is of special concern considering that most households have several domestic animals, which typically includes several dogs and some individuals of livestock raised in the vicinity of the household. Additionally, *L. interrogans* serovar Canicola was isolated from cases of severe to lethal leptospirosis in the area [28, 53]. Furthermore, only a small percentage of the dog population on these communities is vaccinated against leptospirosis [54, 55].

Most respondents stated that only a few cases of leptospirosis occur yearly in the province of Santa Fe but believed that it was possible for an epidemic outbreak to occur in the area. This perception is in agreement with the data published by the National Health Surveillance System (SIVILA), that shows a total of 27 confirmed cases of leptospirosis in the province of Santa Fe between the epidemiological weeks 1 and 20 of 2016, of which 12 belonged to the department La Capital, where the study area is located [56–58]. However, if we consider the diversity of clinical manifestations of this disease and the limitations of laboratory diagnosis in the area, it is probable that leptospirosis is under-reported here [14, 28, 53].

Similarities between dengue and leptospirosis symptoms and environmental settings are likely contributing to the underestimation of the number of leptospirosis cases [33, 35, 59–61]. Dengue outbreaks during floods such as the 2016 flooding event of the Paraná river [56], may lead to leptospirosis cases being misdiagnosed as dengue. Between the epidemiological weeks 1 and 20 of 2016, 1324 dengue cases were reported for the province of Santa Fe [56]. We conducted the questionnaire during this dengue fever outbreak, when a massive campaign was in place to warn the public about the risk of dengue fever. In this scenario, it was surprising to find that approximately 30% of the respondents considered that they were a greater risk of contracting leptospirosis and 25.5% considered that they were equally exposed to both pathogens. Finally, another factor that may contribute to the underestimation of the number of leptospirosis cases is the fact that the environmental setting of these riverside communities restricts the accessibility to health care services and laboratory diagnosis.

Overall, knowledge about leptospirosis appeared to decrease as the distance to the city of Santa Fe increases. This could be attributed to a greater distance to the hospitals and to a more limited access to information by the inhabitants of rural areas [62–64], even though all of them are settlements with apparently similar living conditions. Site differences were not observed in people’s attitudes and practices.

Our modeling efforts for explaining the variation in using preventive practices suggest that men have higher risk of contracting leptospirosis than females. In contrast to males, most of the female surveyed said they never went fishing (63.8%), never went hunting (94.2%), never go to the island (63.8%) or spent the night at the island (76.8%) and do not swim in the river (72.5%) (S2 Table). While in other activities such as collecting firewood, gardening and crossing puddles, no significant differences were observed between men and women (S2 Table). We also found that many of the men are engaged in fishing (31.8%) and most of the women are either housewives or unemployed (63.8%). This is in agreement with other studies that

found a greater probability of infection in men than in females and have provided as a possible explanation to this gender differences the greater engagement of males in outdoor recreational and/or labor activities [1, 7, 11, 14, 25, 28, 32, 33, 44]. We also found that the likelihood of using preventive practices increased with knowledge. Most studies on leptospirosis KAP were descriptive and did not tried to identify factors that may influence the predisposition to use preventive practices [9, 33, 35, 37, 44, 65]. Our results are consistent with those of Arbiol et al. [32], Lau et al. [7] and other studies regarding zoonotic disease prevention practices that show that greater knowledge about the disease results in a greater adoption of preventive practices [31, 45].

The findings should be considered within the limitations of the study. The relatively homogeneous socio-demographic composition of the sample may have impacted on the significance of socio-demographic parameters on preventive practices. Another limitation of this study was the small sample size that may have precluded us from detecting a meaningful effect of other socio-demographic factors. In regards to generalization, our conclusions can only be extrapolated to similar riverside settlements in the region, where subsistence fishing is a common occupation among residents.

The results of this study suggest that increasing knowledge about leptospirosis is key for promoting desired, positive behaviors in the community, rather than changing the attitudes towards the disease. Thus, our study underscores the importance of implementing a diverse array of information, education and communication activities to achieve a better understanding of the symptoms, treatment and prevention of leptospirosis by the various actors involved. Health education should reach healthcare providers and the general public, in particular high-risk groups. In these riverside communities, a key challenge lies in identifying effective strategies to reach the principal high-risk group for leptospirosis: males who work or perform recreational activities outdoors and spend time in precarious campsites in the river islands. In this respect, one promising and innovative approach is the development and implementation of social marketing campaigns that use concepts and tools from marketing to reach the public and try to “promote socially beneficial behavior change” [66]. This strategy has been applied successfully to increase global awareness of the Chagas disease issues in a campaign that involved the participation of popular artists and athletes [67]. These campaigns should be designed for specific communities, given that the barriers to engaging in leptospirosis preventive practices are known to differ among communities [51]. For the present study, we developed a flier tailored to the riverside communities (see [S1 Fig](#) that was explained after conducting the questionnaire, and we offered outreach workshops for the local schools. These instances provided opportunities to exchange ideas about preventive practices that seemed more attainable.

To identify means to improve public access to information on prevention practices and to adequate health care for early diagnosis and treatment, it is necessary to conform teams composed by health workers, researchers and policy makers. The interdisciplinary approaches to public health issues, promote a better understanding of the problems and provide comprehensive solutions for different scenarios [68, 69]. In order for these teams to develop more effective public health policies and programs, they need access not only to high-quality epidemiological data [13], but also to relevant sociocultural information [70].

Supporting information

S1 Table. Questionnaire implemented at the study sites (in Spanish). The questions used in the construction of knowledge score are highlighted in yellow, those used in the construction of attitudes score are highlighted in green, and those used in the practices score are highlighted

in pink.
(PDF)

S2 Table. Frequencies (%) of risk practices performed and risk situations avoided by female and male respondents (n = 113).

(PDF)

S1 Fig. Informative flier given and explained to survey respondents (in Spanish).

(PDF)

Acknowledgments

We would like to thank the students from the Universidad Nacional del Litoral involved in the project for their assistance in conducting the study: Cintia Palavecino, Eric Riera, Franco Abatilli, Guillermo Ursini, Gustavo Gutscher, Jonatan Vega, José Mancilla, Matías Hubeaut and Sofia Nóbili. We also would like to thank Julieta Passegi and Paola D'Imperio for their help in identifying suitable study sites and designing the questionnaire. We are also very thankful to the residents of La Vuelta del Paraguayo, Colastiné Sur and Los Zapallos who participated in this study. We also would like to thank Federico Costa and Claudia Munoz-Zanzi for sharing examples of surveys and for their valuable input that significantly improved the quality of this research. Finally, we would like to thank anonymous reviewers for their suggestions that also improved the quality of this manuscript.

Author Contributions

Conceptualization: M. Andrea Previtali.

Data curation: Tamara Ricardo, Laura C. Bergero, Esteban P. Bulgarella.

Formal analysis: Tamara Ricardo, Esteban P. Bulgarella.

Funding acquisition: M. Andrea Previtali.

Investigation: Tamara Ricardo, Laura C. Bergero, M. Andrea Previtali.

Methodology: Tamara Ricardo, Laura C. Bergero, Esteban P. Bulgarella, M. Andrea Previtali.

Project administration: M. Andrea Previtali.

Resources: Laura C. Bergero.

Supervision: M. Andrea Previtali.

Visualization: Tamara Ricardo, M. Andrea Previtali.

Writing – original draft: Tamara Ricardo, M. Andrea Previtali.

Writing – review & editing: Tamara Ricardo, Laura C. Bergero, Esteban P. Bulgarella, M. Andrea Previtali.

References

1. Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in humans. In: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* vol. 387; 2015. p. 65–97.
2. Céspedes M. Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Reemergente. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2005; 22(4):290–307.
3. Trueba G, Zapata S, Madrid K, Cullen P, Haake D. Cell aggregation: A mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int Microbiol.* 2004; 7(1):35–40. PMID: [15179605](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15179605/)

4. WHO. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. WHO Libr. 2003; 45(5):1–109.
5. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. Leptospira: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009; 7(10):736–747. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2208> PMID: 19756012
6. Leibler JH, Zakhour CM, Gadhoke P, Gaeta JM. Zoonotic and Vector-Borne Infections Among Urban Homeless and Marginalized People in the United States and Europe, 1990–2014. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2016; 16(7):435–444. <https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1863> PMID: 27159039
7. Lau CL, Watson CH, Lowry JH, David MC, Craig SB, Wynwood SJ, et al. Human Leptospirosis Infection in Fiji: An Eco-epidemiological Approach to Identifying Risk Factors and Environmental Drivers for Transmission. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(1):e0004405. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004405> PMID: 26820752
8. MSAL. Enfermedades Infecciosas, Leptospirosis. Guía para el Equipo de Salud. Cdad. Autónoma de Bs. As., Argentina: Dirección de Epidemiología—Ministerio de Salud de la Nación; 2014. Available from: <https://www.argentina.gob.ar/salud>.
9. Navegantes de Araújo W, Finkmoore B, Ribeiro GS, Reis RB, Felzemburgh RDM, Hagan JE, et al. Knowledge, attitudes, and practices related to leptospirosis among urban slum residents in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2013; 88(2):359–363. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0245> PMID: 23269657
10. Maciel EAP, de Carvalho ALF, Nascimento SF, de Matos RB, Gouveia EL, Reis MG, et al. Household transmission of Leptospira infection in urban slum communities. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008; 2(1):e154. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000154> PMID: 18357340
11. Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RDM, Santana FS, Mohr S, Melendez AXTO, et al. Impact of environment and social gradient on Leptospira infection in urban slums. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008; 2(4):e228. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000228> PMID: 18431445
12. Sarkar U, Nascimento S, Barbosa R, For MbCCloRF, Leptospirosis During an Urban Epidemics R, Nuevo H, et al. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *Am J Trop Med Hyg*. 2002; 66(5):605–10. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.605> PMID: 12201599
13. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(9):0–1. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>
14. Torgerson PR, Hagan JE, Costa F, Calcagno J, Kane M, Martinez-Silveira MS, et al. Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(10):e0004122. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004122> PMID: 26431366
15. Lau CL, Smythe LD, Craig SB, Weinstein P. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: Fuelling the fire? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010; 104(10):631–638. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.07.002> PMID: 20813388
16. Schneider MC, Leonel DG, Hamrick PN, Pacheco De Caldas E, Velásquez RT, Mendigaña Paez FA, et al. Leptospirosis in Latin America: exploring the first set of regional data. *Rev Panam Salud Publica*. 2017; 41:1–9.
17. Costa F, Martinez-Silveira MS, Hagan JE, Hartskeerl RA, Dos Reis MG, Ko AI. Surveillance for Leptospirosis in the Americas, 1996-2005: A Review of Data from Ministries of Health. *Rev Panam Salud Pública*. 2012; 32(3):169–77. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892012000900001> PMID: 23183556
18. MSAL. Boletín Integrado de Vigilancia N° 393—SE 1—Enero de 2018. Secretaría de Promoción y programas sanitarios—Ministerio de Salud de la Nación; 2018. Available from: <https://www.argentina.gob.ar/salud>.
19. MSAL. Boletín Integrado de Vigilancia N° 343—SE 2—Enero de 2017. Secretaría de Promoción y programas sanitarios—Ministerio de Salud de la Nación; 2017. Available from: <https://www.argentina.gob.ar/salud>.
20. MSAL. Boletín Integrado de Vigilancia N° 293—SE 2—Enero de 2016. Secretaría de Promoción y programas sanitarios—Ministerio de Salud de la Nación; 2016. Available from: <https://www.argentina.gob.ar/salud>.
21. MSAL. Boletín Integrado de Vigilancia N° 241—SE 1—Enero de 2015. Secretaría de Promoción y programas sanitarios—Ministerio de Salud de la Nación; 2015. Available from: <https://www.argentina.gob.ar/salud>.
22. MSAL. Boletín Integrado de Vigilancia N° 200—SE 52—Diciembre de 2013. Secretaría de Promoción y programas sanitarios—Ministerio de Salud de la Nación; 2013. Available from: <https://www.argentina.gob.ar/salud>.

23. MSAL. Boletín Integrado de Vigilancia N° 119—SE 19—Mayo de 2012. Secretaría de Promoción y programas sanitarios—Ministerio de Salud de la Nación; 2012. Available from: <https://www.argentina.gov.ar/salud>.
24. Vanasco NB, Schmeling MF, Lottersberger J, Costa F, Ko AI, Tarabla HD. Clinical characteristics and risk factors of human leptospirosis in Argentina (1999-2005). *Acta Trop*. 2008; 107(3):255–258. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.06.007> PMID: 18671932
25. Vanasco NB, Sequeira G, Dalla Fontana ML, Fusco S, Sequeira MD, Enria D. Report on a leptospirosis outbreak in the city of Santa Fe, Argentina, March-April 1998. *Rev Panam Salud Pública*. 2000; 7(1):35–40. PMID: 10715972
26. CCLA-AAVLD. Informe sobre Leptospirosis en la República Argentina. Buenos Aires: Comisión Científica sobre Leptospirosis en la República Argentina (CCLA)—Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico (AAVLD). Fundación Mundo Sano; 2002. Publicación monográfica: 3.
27. Cacchione RA, Cascelli ES, Martínez ES. Encuesta serológica sobre leptospirosis humana en Argentina [Serologic survey on human leptospirosis in Argentina]. *Rev Asoc Argent Microbiol*. 1975; 7(1):21–27.
28. Cudós MC, Landolt N, Jacob P, Schmeling MF, Chiani Y, Brazza S, et al. Vigilancia Intensificada De Leptospirosis En Santa Fe Y Entre Ríos (2012-2013). *Rev Argent Salud Pública*. 2014; 5(18):24–30.
29. Cudós MC, Schmeling MF, Chiani Y, Landolt N, Jacob P, Grubert S, et al. Descripción de tres brotes de leptospirosis en escenarios epidemiológicos emergentes. In: 1er Simp. Nac. Vigil. la Salud. Buenos Aires; 2013.
30. Vanasco NB, Fusco S, Zanuttini JC, Manattini S, Dalla Fontana ML, Prez J, et al. [Outbreak of human leptospirosis after a flood in Reconquista, Santa Fe, 1998]. *Rev Argent Microbiol*. 2002; 34(3):124–131. PMID: 12415894
31. Lugova H, Wallis S. Cross-Sectional Survey on the Dengue Knowledge, Attitudes and Preventive Practices Among Students and Staff of a Public University in Malaysia. *J Community Health*. 2017; 42(2):413–420. <https://doi.org/10.1007/s10900-016-0270-y> PMID: 27696137
32. Arbiol J, Orencio P, Romena N, Nomura H, Takahashi Y, Yabe M. Knowledge, Attitude and Practices towards Leptospirosis among Lakeshore Communities of Calamba and Los Baños, Laguna, Philippines. *Agriculture*. 2016; 6(2)(18):12 pp. <https://doi.org/10.3390/agriculture6020018>
33. Sakinah SNS, Suhailah S, Jamaluddin TZMT, Norbaya SM, Malina O. Seroprevalence of Leptospiral Antibodies and Knowledge, Attitude and Practices of Leptospirosis To Non High Risk Group in Selangor. *Int J Public Heal Clin Sci*. 2015; 2(1):92–104.
34. Samarakoon YM, Gunawardena N. Knowledge and self-reported practices regarding leptospirosis among adolescent school children in a highly endemic rural area in Sri Lanka. *Rural Remote Health*. 2013; 13(4):12 pp.
35. Mohan ARM, Chadee DD. Knowledge, attitudes and practices of Trinidadian households regarding leptospirosis and related matters. *Int Health*. 2011; 3(2):131–137. <https://doi.org/10.1016/j.inhe.2011.03.002> PMID: 24038186
36. Essi MJ, Njoya O. Point de vue L'Enquête CAP (Connaissances, Attitudes, Pratiques) en Recherche Médicale. *Heal Sci Dis Vol*. 2013; 14(2):3 pp.
37. Rahim MS, Nazri MS, Rusli MA. Town Service Workers' Knowledge, Attitude and Practice towards Leptospirosis. *Brunei Darussalam J Heal*. 2012; 5:1–12.
38. IPEC-INDEC. Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2010; Provincia de Santa Fe; Available from: [https://www.santafe.gov.ar/index.php/web/content/view/full/163622/\(subtema\)/93664](https://www.santafe.gov.ar/index.php/web/content/view/full/163622/(subtema)/93664).
39. QGIS Development Team. QGIS Geographic Information System 3.0 Girona; 2018. Available from: <http://qgis.osgeo.org>.
40. Congedo L. Semi-Automatic Classification plugin for QGIS. Sapienza Univ. 2013; Rome:1–25.
41. IPEC-INDEC. Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2010; Ciudad de Santa Fe por Radio Censal; Available from: [https://www.santafe.gov.ar/index.php/web/content/view/full/163619/\(subtema\)/93664](https://www.santafe.gov.ar/index.php/web/content/view/full/163619/(subtema)/93664).
42. Rittaca M, Vittori M. La Vuelta del Paraguay, el más islero de la ciudad; 2013. Available from: http://www.ellitoral.com/index.php/idf_}um/85169-la-vuelta-del-paraguay-el-ms-islero-de-la-ciudad.
43. Rittaca M, Vittori M, Vittori MS. El agua, el mayor de los problemas; 2014. Available from: http://www.ellitoral.com/index.php/idf_}um/105176-el-agua-el-mayor-de-los-problemas.
44. Agampodi SB, Agampodi TC, Thalagala E, Perera S, Chandraratne S, Fernando S. Do People Know Adequately about Leptospirosis? A Knowledge Assessment Survey in Post outbreak Situation in Sri Lanka. *Int J Prev Med*. 2015; 1(3):158–163.

45. Davlin SL, Lapiz SM, Miranda ME, Murray KO. Knowledge, attitudes, and practices regarding rabies in Filipinos following implementation of the Bohol Rabies Prevention and Elimination Programme. *Epidemiol Infect.* 2014; 142(07):1476–1485. <https://doi.org/10.1017/S0950268813002513> PMID: 24093635
46. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing; 2017. Available from: <http://www.r-project.org/>.
47. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4. *JSS J Stat Softw.* 2014; 67(1):48.
48. Halekoh U, Højsgaard S. A Kenward-Roger Approximation and Parametric Bootstrap Methods for Tests in Linear Mixed Models—The R Package pbkrtest. *J Stat Softw.* 2014; 59(9):1–32. <https://doi.org/10.18637/jss.v059.i09>
49. Burnham KP, Anderson DR, Huyvaert KP. AIC model selection and multimodel inference in behavioral ecology: Some background, observations, and comparisons. *Behav Ecol Sociobiol.* 2011; 65(1):23–35. <https://doi.org/10.1007/s00265-010-1029-6>
50. Barton K. MuMIn: Multi-model inference. R package version 1.15.6.; 2016. Available from: <http://cran.r-project.org/package=MuMIn>.
51. Mason MR, Gonzalez M, Hodges JS, Muñoz-Zanzi C. Protective practices against zoonotic infections among rural and slum communities from South Central Chile. *BMC Public Health.* 2015; 15(1):1–15.
52. Abiyi EA, Inabo HI, Jatau ED, Makinde AA, Sar TT, Ugbe DA, et al. Knowledge, attitudes, risk factors and practices (KARP) that favor *Leptospira* infection among abattoir workers in North Central Nigeria. *Asian J Epidemiol.* 2015; 8(4):104–113. <https://doi.org/10.3923/aje.2015.104.113>
53. Chiani Y, Jacob P, Varni V, Landolt N, Schmeling MF, Pujato N, et al. Isolation and clinical sample typing of human leptospirosis cases in Argentina. *Infect Genet Evol.* 2016; 37:245–251. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.11.033> PMID: 26658064
54. Lelu M, Muñoz-Zanzi C, Higgins B, Galloway R. Seroepidemiology of leptospirosis in dogs from rural and slum communities of Los Rios Region, Chile. *BMC Vet Res.* 2015; 11(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0341-9> PMID: 25880871
55. Chiani Y. Desarrollo y Validación de Técnicas Diagnósticas de Leptospirosis Canina [M.Sc. Thesis]. Universidad Nacional del Litoral; 2013. Available from: <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/tesis/handle/11185/434>.
56. MSAL. Boletín Integrado de Vigilancia N° 311—SE 21—Mayo de 2016. Secretaría de Promoción y programas sanitarios—Ministerio de Salud de la Nación; 2016. Available from: <https://www.argentina.gob.ar/salud>.
57. MSAL. Boletín Integrado de Vigilancia N° 315—SE 25—Junio de 2016. Secretaría de Promoción y programas sanitarios—Ministerio de Salud de la Nación; 2016. Available from: <https://www.argentina.gob.ar/salud>.
58. INER. Vigilancia de leptospirosis por el laboratorio en argentina (2016). Santa Fe: Laboratorio de Referencia Nacional de Leptospirosis del INER “Dr. E. Coni” Coordinador de la Red Nacional de Laboratorios de Leptospirosis; 2016. Available from: http://www.anlis.gov.ar/iner/?page_f_id=1665.
59. Libraty DH, Myint KSA, Murray CK, Gibbons RV, Mammen MP, Endy TP, et al. A comparative study of leptospirosis and dengue in Thai children. *PLoS Negl Trop Dis.* 2007; 1(3):e111. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000111> PMID: 18160980
60. LaRocque RC, Breiman RF, Ari MD, Morey RE, Janan FA, Hayes JM, et al. Leptospirosis during dengue outbreak, Bangladesh. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11(5):766–769. <https://doi.org/10.3201/eid1105.041212> PMID: 15890136
61. Sanders EJ, Rigau-Pérez JG, Smits HL, Deseda CC, Vorndam VA, Aye T, et al. Increase of leptospirosis in dengue-negative patients after a Hurricane in Puerto Rico in 1966. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 61(3):399–404. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.399> PMID: 10497979
62. Heshmat R, Abdollahi Z, Ghotbabadi FS, Rostami M, Shafiee G, Qorbani M, et al. Nutritional knowledge, attitude and practice toward micronutrients among Iranian households: the NUTRI-KAP survey. *J Diabetes Metab Disord.* 2015; 15(1):42. <https://doi.org/10.1186/s40200-016-0260-8> PMID: 27709106
63. Teferi J, Shewangizaw Z. Assessment of knowledge, attitude, and practice related to epilepsy: A community-based study. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2015; 11:1239–1246. <https://doi.org/10.2147/NDT.S82328> PMID: 26056455
64. Barkat A, Helali J, Rahman M, Majid M, Bose M. Knowledge attitude perception and practices relevant to the utilization of emergency obstetric care services in Bangladesh: a formative study.; 1995.
65. Quina CR, Almazan JU, Tagarino JB. Knowledge, Attitudes, and Practices of Leptospirosis in Catbalogan City, Samar, Philippines. *Am J Public Heal Res.* 2014; 2(3):91–98. <https://doi.org/10.12691/ajphr-2-3-5>

66. Grier S, Bryant CA. Social Marketing in Public Health. *Annu Rev Public Health*. 2005; 26(1):319–339. <https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.26.021304.144610> PMID: 15760292
67. Beat Chagas;. Available from: <http://beatchagas.org/>.
68. Sanmartino M, Amieva C, Balsalobre A, Carrillo A, Marti G, Medone P, et al. *Hablamos de Chagas: aportes para re-pensar la problemática con una mirada integral*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: CONICET—Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas; 2015.
69. Parkes MW, Bienen L, Breilh J, Hsu LN, McDonald M, Patz JA, et al. All Hands on Deck: Transdisciplinary Approaches to Emerging Infectious Disease. *Ecohealth*. 2005; 2(4):258–272.
70. Bardosh K. Global aspirations, local realities: The role of social science research in controlling neglected tropical diseases. *Infect Dis Poverty*. 2014; 3(1):1–15.