



Universidad
Nacional
de Loja

Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

Carrera de Medicina Veterinaria

Detección de *Leptospira* spp. en bovinos en el centro de faenamiento del cantón Catamayo de la provincia de Loja

Trabajo de Integración Curricular
previo a la obtención del título de Médica
Veterinaria

AUTORA:

Dannia Belén Esparza Chamba

DIRECTORA:

MVZ. Jhuliana Katherine Luna Herrera, Mg. Sc.

Loja – Ecuador

2023

Certificación

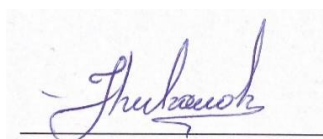
Loja, 24 de febrero de 2023

MVZ. Jhuliana Katherine Luna Herrera Mg. Sc.

DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICO:

Que he revisado y orientado todo el proceso de elaboración del Trabajo de Integración Curricular denominado: **Detección de *Leptospira* spp. en bovinos en el centro de faenamiento del cantón Catamayo de la provincia de Loja**, previo a la obtención del título de **Médica Veterinaria**, de la autoría de la estudiante **Dannia Belén Esparza Chamba**, con **cédula de identidad Nro. 1900853910**, una vez que el trabajo cumple con todos los requisitos exigidos por la Universidad Nacional de Loja, para el efecto, autorizo la presentación del mismo para su respectiva sustentación y defensa.



MVZ. Jhuliana Katherine Luna Herrera Mg. Sc.

DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Autoría

Yo, **Dannia Belén Esparza Chamba**, declaro ser autora del presente Trabajo de Integración Curricular y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos y acciones legales, por el contenido del mismo. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación de mi Trabajo de Integración Curricular, en el Repositorio Digital Institucional – Biblioteca Virtual.

Firma: 

Cédula de identidad: 1900853910

Fecha: 06 de junio de 2023

Correo electrónico: dannia.esparza@unl.edu.ec

Teléfono: 0979739624

Carta de autorización por parte de la autora, para consulta, reproducción parcial o total y/o publicación electrónica del texto completo, del Trabajo de Integración Curricular

Yo, **Dannia Belén Esparza Chamba**, declaro ser autora del Trabajo de Integración Curricular denominado: **Detección de *Leptospira* spp. en bovinos en el centro de faenamiento del cantón Catamayo de la provincia de Loja**, como requisito para optar por el título de **Médica Veterinaria**, autorizo al sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que, con fines académicos, muestre la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido en el Repositorio Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el Repositorio Institucional, en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia del Trabajo de Integración Curricular que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los seis días del mes de junio de dos mil veintitrés.

Firma: 

Autora: Dannia Belén Esparza Chamba

Cédula: 1900853910

Dirección: Loja, calle Quito entre Sucre y Bolívar

Correo electrónico: dannia.esparza@unl.edu.ec

Teléfono: 0979739624

DATOS COMPLEMENTARIOS:

Directora del Trabajo de Integración Curricular: MVZ. Jhuliana Katherine Luna Herrera, Mg. Sc.

Dedicatoria

Dedico este trabajo al mayor regalo de amor que Dios me ha hecho, mis padres y hermanos, por celebrar conmigo los momentos buenos y sostenerme con paciencia en los difíciles.

Dannia Belén Esparza Chamba

Agradecimiento

Agradezco a Dios por su infinita bondad.

A la Universidad Nacional de Loja y a todos mis maestros por los conocimientos compartidos, de manera especial a la MVZ. Jhuliana Luna Mg. Sc. y al MVZ. Roberto Bustillos. Mg. Sc. por dirigir y ofrecer su apoyo incondicional en la elaboración de este trabajo.

Finalmente, agradezco eternamente a mis padres y hermanos por todo su amor y amparo, a mis amigos y a todas las personas que entregaron su colaboración en esta investigación.

Dannia Belén Esparza Chamba

Índice de Contenidos

Portada.....	i
Certificación.....	ii
Autoría.....	iii
Carta de autorización.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento.....	vi
Índice de Contenidos.....	vii
Índice de Tablas.....	ix
Índice de Figuras.....	x
Índice de Anexos.....	xi
1. Título.....	1
2. Resumen.....	2
2.1. Abstract.....	3
3. Introducción.....	4
4. Marco Teórico.....	6
4.1. Etiología.....	6
4.1.1. Clasificación Taxonómica.....	6
4.1.2. Clasificación Serológica.....	6
4.1.3. Clasificación Genotípica.....	7
4.2. Características de la Bacteria.....	7
4.2.1. Características Morfológicas y Estructurales.....	7
4.2.2. Características Microbiológicas.....	8
4.3. Transmisión.....	9
4.4. Patogenia.....	10
4.4.1. Fase Leptospirémica.....	10
4.4.2. Leptospiruria.....	10
4.4.3. Evasión del Sistema Inmunológico del Huésped y Factores de Virulencia.....	11
4.5. Características Clínicas.....	11
4.6. Lesiones Macro y Microscópicas.....	12
4.7. Diagnóstico.....	14
4.7.1. Serología.....	15
4.7.2. Microbiología.....	17
4.7.3. Molecular.....	18
4.8. Tratamiento.....	19

4.9.	Control y Prevención.....	19
4.10.	Epidemiología.....	20
4.10.1.	<i>Factores de Riesgo</i>	21
5.	Materiales y Métodos.....	22
5.1.	Área de Estudio.....	22
5.2.	Procedimiento.....	22
5.2.1.	<i>Enfoque Metodológico</i>	22
5.2.2.	<i>Diseño de la Investigación</i>	22
5.2.3.	<i>Tamaño de la Muestra y Tipo de Muestreo</i>	22
5.2.4.	<i>Variables de Estudio</i>	22
5.2.5.	<i>Métodos y Técnicas</i>	23
5.3.	Definición de Caso.....	24
5.4.	Procesamiento y Análisis de la Información.....	25
5.5.	Consideraciones Éticas.....	25
6.	Resultados.....	26
6.1.	Características de los Animales Estudiados.....	26
6.2.	Frecuencia de la Infección por <i>Leptospira</i> spp.	26
6.3.	Factores Asociados a la Presencia de Anticuerpos por <i>Leptospira</i> spp.	27
7.	Discusión.....	29
8.	Conclusiones.....	32
9.	Recomendaciones.....	33
10.	Bibliografía.....	34
11.	Anexos.....	43

Índice de Tablas

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la leptospirosis y su propósito	15
Tabla 2. Caracterización de las variables	23
Tabla 3. Características de los bovinos faenados considerados para el estudio (n=100).....	26
Tabla 4. Serovares de <i>Leptospira</i> circulantes en bovinos faenados en el camal municipal del cantón Catamayo de la provincia de Loja (n=100).....	27
Tabla 5. Características asociadas a seropositivos en el análisis bivariado (n=100)	27

Índice de Figuras

Figura 1. Cultivo puro de leptospiras utilizando inmunofluorescencia directa (IFD) (200X)..	8
Figura 2. Leptospira interrogans cepa RGA obtenida por microscopia electrónica de barrido	8
Figura 3. Colestasis en hígado de toro con leptospirosis	12
Figura 4. Nefritis intersticial en riñón de buey con leptospirosis	13
Figura 5. Nefritis túbulo-intersticial linfoplasmocítica en riñón de buey con leptospirosis ...	13
Figura 6. Espiroquetas en la pared tubular en riñón de toro con leptospirosis	14
Figura 7. Espiroquetas oscuras en riñón de toro con leptospirosis	14

Índice de Anexos

Anexo 1. Hoja de registro	43
Anexo 2. Certificado de traducción del resumen.....	43

1. Título

Detección de *Leptospira* spp. en bovinos en el centro de faenamiento del cantón Catamayo de la provincia de Loja

2. Resumen

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial, que afecta a animales domésticos y silvestres, y cuyo principal reservorio son los roedores. La leptospirosis bovina causa numerosas pérdidas productivas y económicas y son necesarias las investigaciones sobre su epidemiología en el Ecuador. Los objetivos de esta investigación fueron identificar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp. en muestras de suero y del patógeno en orina en bovinos faenados en el cantón Catamayo de la provincia de Loja, así como también determinar los factores asociados a la leptospirosis. Se tomaron muestras de suero y orina de 100 bovinos mayores a 3 años, faenados durante los meses de noviembre y diciembre de 2022. Las muestras fueron analizadas mediante serología (MAT) y PCR convencional para el gen *hap1* de 262 pb, respectivamente. La presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp. fue del 16 % (16/100) y se identificaron 8 serovares circulantes: Hebdomadis, Australis, Autumnalis, Icterohaemorrhagiae, Grippityphosa, Canicola, Copenhageni y Bataviae; ningún animal resultó positivo a la presencia de *Leptospira* patógena en orina; y los factores sexo, raza, edad y procedencia de los animales no estuvieron asociados a la presencia de la enfermedad. En conclusión, hubo presencia de leptospirosis en los bovinos faenados en el cantón Catamayo aunque no se determinaron factores asociados a la misma.

Palabras clave: leptospirosis, MAT, PCR, Ecuador

2.1. Abstract

Leptospirosis is a zoonotic disease of worldwide distribution affecting domestic and wild animals. And whose main reservoirs are rodents. Bovine leptospirosis causes numerous productive and economic losses, and research on its epidemiology in Ecuador is necessary. The objectives of this research were to identify the presence of antibodies against *Leptospira* spp. in serum and urine samples of the pathogen in cattle slaughtered in the Catamayo canton of Loja province, as well as to determine the factors associated with leptospirosis, we took serum and urine samples from 100 cattle over three years old, slaughtered during the months of November and December 2022, we analyzed the samples by serology (MAT) and conventional PCR for the 262 bp hap1 gene respectively. The presence of antibodies against *Leptospira* spp. was 16 % (16/100), and we identified eight circulating serovars: Hebdomadis, Australis, Autumnalis, Icterohaemorrhagiae, Grippytyphosa, Canicola, Copenhageni and Bataviae; no animal tested positive for the presence of pathogenic *Leptospira* in urine; and the factors sex, breed, age, and origin of the animals were not associated with the presence of the disease. In conclusion, we found the occurrence of leptospirosis in cattle slaughtered in Catamayo, although we did not determine factors that are closely associated with the disease.

Keywords: leptospirosis, MAT, PCR, Ecuador

3. Introducción

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica reemergente de distribución mundial que tiene mayor prevalencia en países tropicales, subtropicales y templados (Bertelloni et al., 2019) y que es causada por bacterias patógenas del género *Leptospira* (Loureiro & Lilenbaum, 2020). Estas bacterias infectan al ser humano y a una gran variedad de animales domésticos y silvestres, pero los roedores se consideran los principales reservorios (Boey et al., 2019; Rajeev et al., 2020). La infección en animales puede presentarse de forma sistémica aguda y grave, o bien con poco efecto clínico (Ellis, 2015) y el diagnóstico se realiza mediante pruebas para detectar anticuerpos y pruebas para detectar a las leptospiras, sus antígenos o sus ácidos nucleicos en tejidos animales o en líquidos corporales (OIE, 2021).

La leptospirosis bovina causa pérdidas sobre la producción animal y consecuentes pérdidas económicas debido a múltiples signos como repetición del estro, nacimiento de terneros débiles, aborto, infertilidad, disminución de la producción de leche y mastitis (Góngora et al., 2022; Ibrahim et al., 2022). A estos efectos se suma el riesgo de infección accidental al ser humano y las pérdidas económicas que se generan a causa de las bajas laborales, la pérdida de productividad y capacidad de trabajo, y la adquisición de vestimenta de protección y seguros médicos para el personal en riesgo (Ibrahim et al., 2022).

Son pocas las investigaciones sobre la epidemiología de la leptospirosis bovina que se han llevado a cabo en nuestro país, así, la información de la que se dispone frecuentemente es de las provincias de Loja y Manabí. En cuanto a diagnóstico molecular, en 2016 se obtuvo un 12,22 % de muestras positivas a la presencia de *Leptospira* spp. mediante PCR en ganado lechero del cantón Loja (Román et al., 2016); mientras que en la provincia de Manabí se obtuvo un 11,11 % de muestras positivas a la presencia del gen *hap1* de *Leptospira* (Revelo et al., 2020).

Por otro lado, en la provincia de Manabí se reportó una seroprevalencia general a nivel de hatos del 97,01 % y una seroprevalencia individual de 50,9 % en bovinos sacrificados en el matadero del cantón Manta; en los dos casos, los serovares más frecuentes fueron Pomona, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Bratislava y Canicola (Burgos, Pérez, Goicochea, et al., 2019; Burgos et al., 2020). En el cantón Loja se detectó una seroprevalencia del 74,83 %, con mayor frecuencia de los serovares Bataviae cepa swart, Javanica, Sejroe, Canicola e Icterohaemorrhagiae (Román et al., 2014) y dos años después se obtuvo un 58,60 % de animales seropositivos para *L. interrogans* predominando los serovares Canicola, Sejroe y Hardjo (Barragán, 2016); no obstante, no se han realizado investigaciones a nivel de matadero.

Por tanto, con el fin de obtener información epidemiológica que permita en lo posterior instaurar programas de prevención y control de la enfermedad, y que, a su vez, sirva como base para el desarrollo de estudios futuros se plantearon los siguientes objetivos:

- Identificar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp. en bovinos faenados en el cantón Catamayo de la provincia de Loja.
- Identificar *Leptospira* patógena en orina de bovinos faenados en el cantón Catamayo de la provincia de Loja.
- Determinar los factores asociados a la leptospirosis en bovinos faenados en el cantón Catamayo de la provincia de Loja.

4. Marco Teórico

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica reemergente y aunque es de distribución mundial, tiene mayor prevalencia en países tropicales, subtropicales y templados, donde las condiciones ambientales son óptimas para la supervivencia del agente etiológico (Bertelloni et al., 2019). Esta enfermedad es causada por bacterias patógenas del género *Leptospira* (Loureiro & Lilenbaum, 2020) que infectan al ser humano y a una gran variedad de animales domésticos y silvestres (Boey et al., 2019), causando infecciones subclínicas o con diversos cuadros clínicos (Soares et al., 2020). La leptospirosis bovina causa importantes pérdidas económicas tanto en las unidades de producción de leche como en las de carne, a causa de abortos, mortinatos, disminución de la producción láctea, infertilidad y nacimiento de terneros débiles (Faine et al., 1999).

4.1. Etiología

4.1.1. Clasificación Taxonómica

El género *Leptospira*, proviene del griego *leptos* (fino o delgado) y del latín *spira* (espiral) (Faine et al., 1999), pertenece a la familia *Leptospiraceae*, orden *Spirochaetales*, clase *Spirochaetia* y filo *Spirochaetes* (Krieg et al., 2010).

4.1.2. Clasificación Serológica

Se han identificado más de 300 serotipos de *Leptospira* spp. que se clasifican en 28 serogrupos de acuerdo a la similitud serológica mediante la prueba de absorción y aglutinación cruzada (CAAT) (Góngora et al., 2022). La clasificación de serovares utiliza anticuerpos policlonales contra los lipopolisacáridos (LPS) de la pared bacteriana o la prueba de aglutinación microscópica (MAT), que es una prueba estándar recomendada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (Cosate et al., 2017).

Los serovares, además de ser la unidad básica sistemática, tienen importancia epidemiológica por la asociación que pueden tener con una especie animal con la que hayan desarrollado una relación comensal o levemente patógena (OMS, 2008). Así, el ganado bovino es huésped de mantenimiento de las cepas del serogrupo Sejroe, principalmente del serovar Hardjo, del cual existen dos tipos genéticamente distintos, pero serológicamente indistinguibles: Hardjoprajitno de la especie *L. interrogans* y Hardjobovis de la especie *L. borgpetersenii* (Loureiro & Lilenbaum, 2020). Por otra parte, los bovinos son huéspedes accidentales de los serovares Pomona, Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae, especie *L. interrogans* (Alinaitwe et al., 2019; Ellis, 2015).

4.1.3. Clasificación Genotípica

El genoma de *Leptospira* spp. es de aproximadamente 5000 kb, dividido en dos secciones de 4400 kb y 350 kb con un contenido de GC de entre 35 y 41 % (Góngora et al., 2022). Gracias al análisis del genoma completo, Vincent et al., (2019) describieron la existencia de 64 especies de *Leptospira* que podían clasificarse en 4 subclados: P1 (patógenas), P2 (intermedias), S1 (saprófitas), S2 (no descrito aún y compuesto por *Leptospira idonii* y 4 especies nuevas filogenéticamente relacionadas a las saprófitas). Actualmente se reconocen 72 especies de *Leptospira* que pueden clasificarse en 3 clados de acuerdo a su nivel de virulencia: P1 (patógenas), P2 (intermedias), S1 (saprófitas) (Abdullah et al., 2021).

4.2. Características de la Bacteria

4.2.1. Características Morfológicas y Estructurales

Las bacterias del género *Leptospira* tienen forma helicoidal enrollada en dirección a las manecillas del reloj, tienen una longitud de 6-20 μm y un diámetro de 0,1 μm (Faine et al., 1999) y presentan en uno o ambos extremos una curvatura leve característica de las leptospiras patógenas (Bautista et al., 2019). No obstante, en condiciones desfavorables de crecimiento, las leptospiras pueden adoptar una forma esférica (Zuerner, 2010). Debido a sus dimensiones largas y delgadas, las células no teñidas no son visibles bajo el microscopio óptico de luz y se requiere microscopía de contraste de fase o de campo oscuro para su visualización (Zuerner, 2010).

Las leptospiras tienen una membrana externa muy fluida y unida débilmente a la célula (se elimina fácilmente con detergentes), que rodea el cilindro protoplásmico, que a su vez facilita la motilidad de las bacterias (Bautista et al., 2019; Zuerner, 2010). La pared celular tiene peptidoglicano que contiene el diaminoácido alfa, ácido épsilon diaminopimélico. Finalmente, tienen dos flagelos o filamentos axiales, necesarios para la motilidad, que se extienden desde cada extremo de la célula y envuelven el cilindro protoplásmico en el espacio periplásmico (Zuerner, 2010).

En las Figuras 1 y 2 se observan leptospiras usando la técnica de inmunofluorescencia directa y usando microscopía electrónica de barrido, respectivamente.

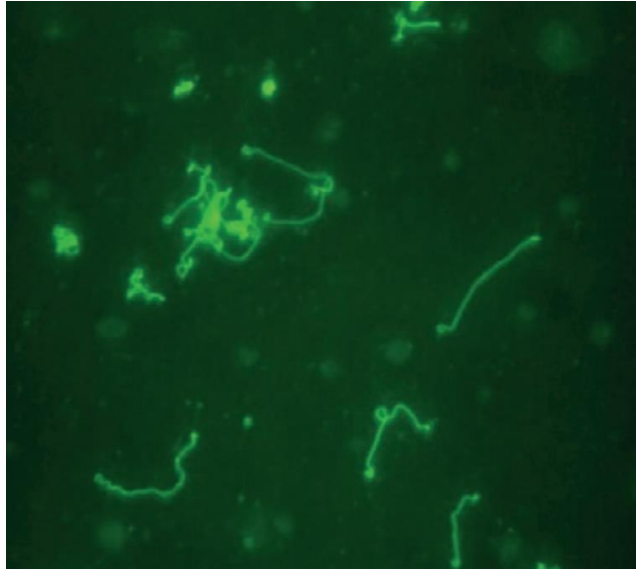


Figura 1. Cultivo puro de leptospiaras utilizando inmunofluorescencia directa (IFD) (200X)

Nota. Adaptado de “Aislamiento de una cepa patógena de *Leptospira* de un río urbano: Respuesta frente a quinolonas fluoradas” (p. 144), por B. Brihuega, C. Auteri, G. Romero, L. Samartino, 2006, *Rev. Med. Vet.*, 87.

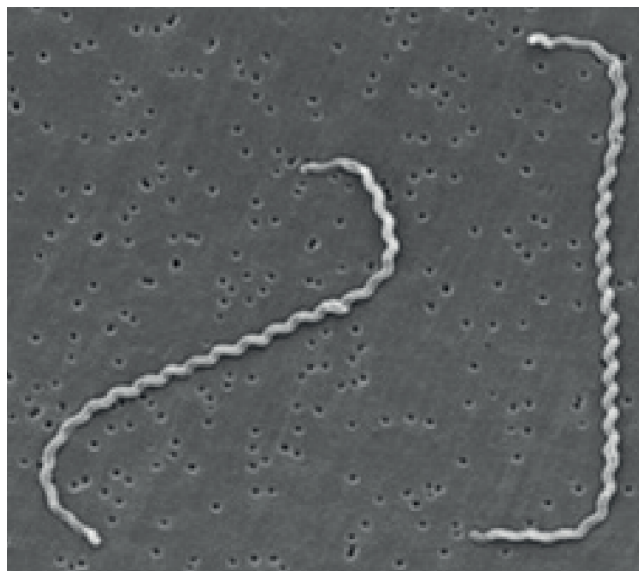


Figura 2. *Leptospira interrogans* cepa RGA obtenida por microscopia electrónica de barrido

Nota. Adaptado de *Leptospira and Leptospirosis* (p. 295), por B. Adler, 2015, Springer.

4.2.2. Características Microbiológicas

Las leptospiaras son bacterias gramnegativas, móviles y aerobias estrictas (Bautista et al., 2019) que crecen a una temperatura óptima de 28 a 30 °C y en un medio con un Ph de 7.2 a 7.6 enriquecido con vitaminas, ácidos grasos de cadena larga y sales de amonio, siendo el medio líquido de cultivo Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) el más usado (Faine et al., 1999). Su crecimiento en placas de agar es lento, las especies saprófitas pueden formar colonias en 10 días, mientras que las patógenas pueden tardar de 6 a 8 semanas. Las colonias son difusas, no pigmentadas, claras a turbias y pueden formarse debajo de la superficie (Zuerner, 2010).

Las leptospiras son sensibles a la radiación ultravioleta, desecación, pasteurización, variaciones en el Ph (desactivándose cuando este es menor a seis o mayor a 8), y a varios antisépticos y desinfectantes (Bautista et al., 2019). Son sensibles a una gran cantidad de antibióticos incluidos betalactámicos (penicilina, ampicilina y amoxicilina), rifampicina, tetraciclina y doxiciclina, cefalosporinas (cefotaxima y ceftizoxima), aminoglucósidos (estreptomicina), macrólidos (eritromicina y azitromicina) y fluoroquinolonas (ciprofloxacina) (Zuerner, 2010).

Por otra parte, son resistentes a las temperaturas en que se almacena el semen (Loureiro & Lilenbaum, 2020). Experimentalmente, el serovar *Icterohaemorrhagiae* muere en 10 minutos a una temperatura de 56 °C y en 10 segundos a 100 °C, además, sobrevive hasta 100 días a -20 °C y dado que es muy sensible a los ácidos, pierde su motilidad en 15 minutos en soluciones de HCL a 1:2000 (Instituto Nacional de Salud, 2000).

Las leptospiras pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo fuera del huésped (Adler et al., 2011). Las fuentes de agua con baja luminosidad, Ph neutro o ligeramente alcalino y con presencia de materia orgánica, son el medio perfecto para su supervivencia; así, los focos de leptospirosis más importantes se encuentran en lagunas, riachuelos y bebederos que congregan un gran número de animales y se encuentran en condiciones de salubridad precarias (Alonso et al., 2001; Jiménez, 2011).

4.3. Transmisión

Cuando las leptospiras penetran al organismo, pasan por vía sanguínea a órganos parenquimatosos como hígado, bazo o riñón y permanecen en lugares donde la actividad de anticuerpos es baja como humores oculares, útero y túbulos renales. Las leptospiras llegan al medio ambiente, principalmente, al ser eliminadas en la orina (Nally et al., 2018), aunque también son excretadas en leche, fluidos fetales y placentarios, descargas uterinas y semen (Loureiro & Lilenbaum, 2020).

Las leptospiras pueden ingresar al organismo por contacto directo con los fluidos corporales mencionados anteriormente, o por contacto indirecto con suelo, agua y alimentos contaminados (Fávero et al., 2017). Los microorganismos generalmente ingresan por las mucosas como las conjuntivas, cortes pequeños, abrasiones, piel húmeda o directamente por vía oral (Bautista et al., 2019). La transmisión horizontal directa es la forma de transmisión más común para serovares adaptados a la especie como es el caso del serovar Hardjo (Loureiro & Lilenbaum, 2020); mientras que la transmisión horizontal indirecta es más importante en las infecciones por serovares accidentales, pues otras especies hospedantes como los cerdos y la vida silvestre actúan como reservorios de la bacteria (Correia et al., 2017). Finalmente, los

animales también enferman por transmisión vertical, tanto por vía transplacentaria como por vía de la leche (Orjuela et al., 2022).

4.4. Patogenia

4.4.1. Fase Leptospirémica

La fase leptospirémica (Asensio et al., 2018), anictérica (Johnson, 2018) o bacteriémica (Lau et al., 2018) es la etapa temprana (aguda) de la infección y se caracteriza por la presencia de las leptospiras en sangre. Las leptospiras pueden llegar al torrente sanguíneo en minutos gracias al movimiento de torsión de los flagelos periplásmicos (Johnson, 2018). La bacteriemia causada por las leptospiras es diferente a la causada por otros agentes bacteriémicos típicos. Es así, que las leptospiras pueden camuflarse de la respuesta inmunitaria innata del huésped, causando daño antes de ser detectadas (Samrot et al., 2021).

Adhesión y Entrada Celular.- Aunque las leptospiras se consideran generalmente patógenos extracelulares, poseen factores de virulencia que les permiten adherirse, ingresar y replicarse dentro de las células huésped (Samrot et al., 2021). La penetración del endotelio de los vasos sanguíneos pequeños es el principal fenómeno patológico de la leptospirosis y pese a que no se comprende completamente cómo ocurre, se infiere que las leptospiras pueden translocarse entre células a través de monocapas polarizadas, pero no pueden hacerlo a través de uniones celulares (Barocchi et al., 2002; Samrot et al., 2021).

Existen varias proteínas que permiten la adhesión de las leptospiras a las células huésped. Estas proteínas pueden unirse no solo a los componentes de la matriz extracelular (MEC) como la fibronectina, elastina, laminina y colágeno, sino también a los reguladores del complemento y al plasminógeno mediante el uso de LigB y LipL32 (Samrot et al., 2021). Un homólogo de la proteína de entrada de células de mamífero (Mce), que normalmente se encuentra en *M. tuberculosis*, también se encuentra en leptospiras patógenas y les permite adherirse a las células huésped (Zhang et al., 2012). Gracias a todas estas proteínas, las leptospiras se unen a células endoteliales, monocitos, células epiteliales renales y células de fibroblastos, logrando colonizar, replicarse y sobrevivir en una amplia variedad de tejidos del huésped (Samrot et al., 2021).

4.4.2. Leptospiruria

La leptospiruria (Asensio et al., 2018) o fase ictérica es la fase tardía de la enfermedad (Lau et al., 2018) y se caracteriza por ser una forma sistémica y extremadamente grave que se manifiesta con ictericia y complicaciones como insuficiencia hepática, insuficiencia renal y shock respiratorio (Samrot et al., 2021). La fase inmunitaria comienza de 7 a 10 días después de la primera aparición de los síntomas y dura hasta 30 días (Asensio et al., 2018).

Dado que la enfermedad permanece sin tratamiento por un largo periodo de tiempo, las leptospiras se vuelven muy invasivas y secretan grandes cantidades de enzimas que degradan la membrana celular (Samrot et al., 2021). Además, se producen otras proteínas como ortólogos de hemolisina y enzimas proteolíticas como colagenasa, metaloproteasa y termolisina, que son necesarias para la degradación de los componentes de la MEC (Nascimento et al., 2004). Como respuesta, el sistema inmune produce grandes cantidades de citocinas y recluta muchos glóbulos blancos; sin embargo, esto no es útil frente a la leptospirosis y puede conducir a una falla multiorgánica y muerte (Samrot et al., 2021).

4.4.3. Evasión del Sistema Inmunológico del Huésped y Factores de Virulencia

Conforme las leptospiras se unen a las células huésped, se liberan citocinas (interleucina-6, interleucina-10 y TNF- α) y péptidos antimicrobianos (AMP) para limitar los daños invasivos que las bacterias causan; en respuesta, las células fagocíticas engullen a las leptospiras, mismas que pueden replicarse y sobrevivir en los fagolisosomas (Samrot et al., 2021). De esta manera, el sistema inmunitario del huésped continúa liberando cantidades excesivas de citocinas, lo que termina como una respuesta destructiva (Cagliero et al., 2018).

Su alta motilidad y resistencia a las proteínas del complemento son mecanismos evasivos de las leptospiras (Samrot et al., 2021). Otros factores de virulencia son su capacidad para formar biopelículas, alta estabilidad de su membrana externa (Johnson, 2018), biosíntesis activa de LPS, absorción de hierro, respuesta innata al estrés y actividad de colagenasa (Bulach & Adler, 2018). Finalmente, las proteínas del sistema de dos componentes (TCS) son responsables de la virulencia de las leptospiras (Samrot et al., 2021).

4.5. Características Clínicas

Se puede clasificar a la leptospirosis bovina en: leptospirosis bovina incidental, causada por serovares mantenidos por otros animales de vida libre o domésticos pero que finalmente infectan a los bovinos; y leptospirosis bovina adaptada, causada por serovares mantenidos por los bovinos como el serovar Hardjo (Ellis, 2015; OIE, 2021). Generalmente, las infecciones incidentales dan como resultado una forma sistémica aguda y grave de la enfermedad; mientras que las infecciones adaptadas suelen ser subclínicas o causan daños mínimos al huésped (Ellis, 2015). De acuerdo con Loureiro & Lilenbaum (2020), las dos formas dan como resultado una leptospirosis crónica con trastornos reproductivos.

En la leptospirosis incidental se identifican con mayor frecuencia los serogrupos Pomona, Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae y su transmisión se asocia a cerdos, roedores y animales salvajes (Delooz et al., 2018; Ellis, 2015). Las infecciones incidentales pueden causar en los terneros formas agudas y severas que cursan con fiebre, depresión, disnea,

hemoglobinuria, hematuria, ictericia, lagrimeo y mortalidad; mientras que en los bovinos adultos causan altas tasas de abortos en los últimos estadios de la gestación (Ellis, 2015) y los fetos abortados muestran ictericia congénita (Delooz et al., 2018).

La leptospirosis adaptada es causada en su mayoría por cepas del serogrupo Sejroe. En estas infecciones, la fase aguda de la enfermedad suele ser subclínica aunque en vacas lactantes puede causar agalactia (Ellis, 2015); la fase crónica es más común (Loureiro & Lilenbaum, 2020) y se presenta de forma subclínica con aborto, pérdidas embrionarias tempranas y repeticiones de estro (Libonati et al., 2018; Mori et al., 2017) dado que las cepas de Sejroe presentan cierto nivel de adaptación al tracto reproductivo (Rocha et al., 2018).

4.6. Lesiones Macro y Microscópicas

Las lesiones que se presentan en la leptospirosis bovina incluyen anemia, ictericia, hemoglobinuria y hemorragias subserosas y submucosas (Radostits et al., 2006). Además, se pueden presentar úlceras y hemorragias en la mucosa del abomaso; el bazo se muestra color rojo ladrillo; a nivel pulmonar se observan congestión y petequias en la mucosa y en casos graves, hay edema pulmonar y enfisema (de Buen de Arguero, 2001; Trigo, 2011). El hígado, como se indica en la Figura 3, se ve inflamado y muestra una decoloración bronceada/verde, lo que sugiere retención de bilis (Buergelt et al., 2017). Finalmente, como se ve en la Figura 4, el riñón presenta una superficie cortical de color gris-marrón con múltiples focos blanquecinos pequeños (Burgos et al., 2020). Muchos bovinos asintomáticos en los mataderos presentan riñones con manchas blancas que pueden ser resultado de infecciones bacterianas anteriores y no deben considerarse patognomónicos de la leptospirosis (Radostits et al., 2006).



Figura 3. Colestasis en hígado de toro con leptospirosis

Nota. El hígado tiene un tinte de bronce y está agrandado. La canal se caracteriza por una decoloración amarilla (ictericia). Las heces tendrán una decoloración verde. Tomado de *Bovine Pathology, a text and color atlas* (p. 184), por Buergelt et al., 2017, CABI.



Figura 4. Nefritis intersticial en riñón de buey con leptospirosis

Nota. Se observan múltiples focos blancos pequeños de inflamación presentes en la superficie cortical. Tomado de *Bovine Pathology, a text and color atlas* (p. 184), por Buergelt et al., 2017, CABI.

Histológicamente, se observa nefritis intersticial focal o difusa con agregados de linfocitos y células plasmáticas en el intersticio, necrosis hepática centrolobulillar y en algunos casos, lesiones vasculares en las meninges y el cerebro en infecciones subagudas a crónicas (Buergelt et al., 2017; Radostits et al., 2006). En la Figura 5 se observa un caso de nefritis tubulointersticial linfoplasmocitaria, que es la lesión más común asociada con infección crónica por leptospirosis (Buergelt et al., 2017; Zachary, 2016). Como se muestra en las Figuras 6 y 7, las leptospiras pueden ser visibles en secciones teñidas con plata, especialmente de los túbulos contorneados proximales del riñón (Radostits et al., 2006).

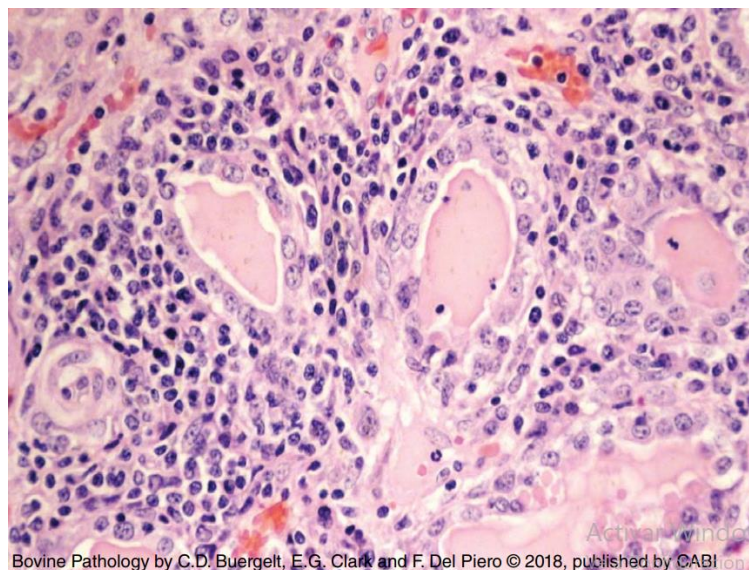


Figura 5. Nefritis túbulo-intersticial linfoplasmocítica en riñón de buey con leptospirosis

Nota. Las acumulaciones moderadas de linfocitos y células plasmáticas infiltran el intersticio. Los túbulos contienen moldes de proteínas. Las células epiteliales tubulares se han secuestrado y están levemente infiltradas por linfocitos (H&E). Tomado de *Bovine Pathology, a text and color atlas* (p. 184), por Buergelt et al., 2017, CABI.

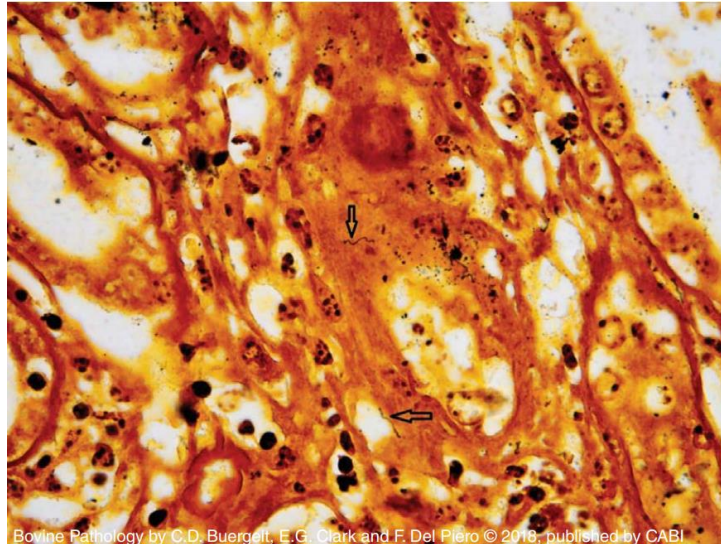


Figura 6. *Espiroquetas en la pared tubular en riñón de toro con leptospirosis*
 Nota. Mediante la tinción de plata de Warthin-Starry se observan espiroquetas intralesionales. Tomado de *Bovine Pathology, a text and color atlas* (p. 184), por Buergelt et al., 2017, CABI.

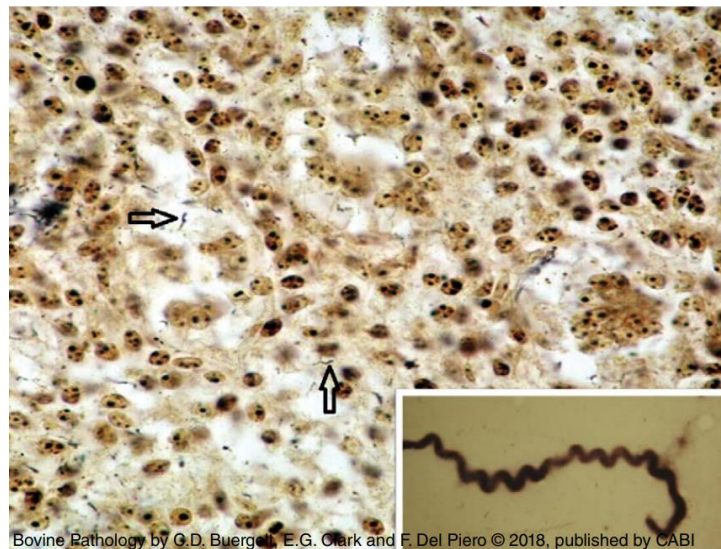


Figura 7. *Espiroquetas oscuras en riñón de toro con leptospirosis*
 Nota. Mediante la tinción de plata de Warthin-Starry se observan espiroquetas. Tomado de *Bovine Pathology, a text and color atlas* (p. 184), por Buergelt et al., 2017, CABI.

Los fetos bovinos abortados generalmente se autolisan a tal punto que no pueden demostrarse lesiones ni bacterias (Radostits et al., 2006). A veces se puede observar ictericia, líquido sanguinolento en cavidades, hemorragia y esplenomegalia (Follmer et al., 2017).

4.7. Diagnóstico

El diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis puede ser complejo y como se presenta en la Tabla 1, se realiza mediante dos tipos de pruebas: 1) aquellas que permiten detectar anticuerpos y 2) aquellas que permiten detectar a las leptospiras, sus antígenos o sus ácidos nucleicos en tejidos o líquidos corporales. La elección de las pruebas a realizar depende del objetivo del análisis y de la disponibilidad y experiencia para realizar las pruebas (OIE, 2021).

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la leptospirosis y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Pruebas para detección de la respuesta inmunitaria						
MAT	-	+++	+	++	+++	+
ELISA	+++	-	+++	+++	++	+++
Pruebas para detección del agente						
Aislamiento e identificación PCR	-	+++	+	+++	-	-
PCR	-	++	-	++	-	-

Nota. +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado, pero con limitaciones; + = puede utilizarse, pero en muy pocas circunstancias; - = no adecuado para este propósito. PCR = reacción en cadena de la polimerasa; MAT = prueba de aglutinación microscópica; ELISA = enzimoimmunoanálisis. Tomado de *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2021*, por OIE, 2021, Comisión de Normas Biológicas.

4.7.1. Serología

Las pruebas serológicas permiten confirmar un diagnóstico clínico, determinar la prevalencia en un rebaño y realizar estudios epidemiológicos. Los anticuerpos contra leptospiras aparecen pocos días después del inicio de la infección y permanecen semanas, meses y hasta años; sin embargo, en animales infectados crónicamente los títulos de anticuerpos pueden bajar a niveles indetectables (Desa et al., 2021; OIE, 2021).

Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT).- La prueba MAT es la prueba serológica estándar para el diagnóstico de leptospirosis (OIE, 2021) y consiste en la mezcla de diluciones seriadas del suero animal con cultivos de distintos serovares de *Leptospira* para detectar los anticuerpos aglutinantes en el suero problema (Faine et al., 1999). Esta prueba utiliza antígenos vivos, por eso, para mayor sensibilidad se deben usar cepas representativas de todos los serogrupos presentes en la región (Ellis, 1986).

La especificidad de la MAT es buena porque normalmente los anticuerpos frente a otras bacterias no dan reacción cruzada significativa con *Leptospira*; no obstante, sí hay reacciones serológicas cruzadas significativas entre serotipos y serogrupos de *Leptospira*, siendo probable que los anticuerpos de un serotipo presente en un animal infectado, den una reacción cruzada

con otros serotipos. Así, la serología no permite identificar definitivamente el serotipo en una infección individual o en un brote; pero, en áreas donde se han descrito los serotipos presentes mediante estudios de aislamiento, si puede sugerir el serotipo infectante (OIE, 2021). Finalmente, los bovinos vacunados contra leptospirosis pueden tener anticuerpos frente a los serotipos de la vacuna por lo que es importante considerar el registro de vacunación de los animales (Faine et al., 1999).

Interpretación y Limitaciones.- Aunque se considera positivo un título de 1/100, dada la alta especificidad de la MAT, pueden tomarse títulos menores como signo de exposición a *Leptospira* (OIE, 2021).

Para diagnosticar infección aguda en un animal debe demostrarse un aumento de cuatro veces en los títulos de anticuerpos en muestras pareadas de sueros (una muestra del animal con enfermedad aguda y otra muestra del animal ya recuperado); además, un diagnóstico de leptospirosis puede basarse en el hallazgo de títulos muy altos en un animal con un cuadro clínico bien definido (OIE, 2021). La MAT tiene limitaciones en el diagnóstico de la infección crónica en animales individuales, tanto en el diagnóstico de abortos como en la identificación de portadores renales o genitales, particularmente en infecciones por el serotipo Hardjo (Ellis, 1986). Cuando se toma como significativo un título de 1/100 o mayor, la sensibilidad de la prueba es del 41 %, e incluso cuando el título significativo mínimo se reduce a 1/10, la sensibilidad solo es del 67 % (Ellis, 1986). La demostración de anticuerpos en la sangre fetal sirve de diagnóstico pero los títulos son con frecuencia muy bajos (OIE, 2021).

La MAT tiene mayor uso como prueba de rebaño, pero se deben tomar muestras de 10 animales o del 10 % del hato, la que mayor sea. Para el diagnóstico serológico deben considerarse el serotipo infectante y el estado clínico: los animales infectados por el serotipo Pomona presentan aborto relativamente pronto después de la infección y la respuesta serológica consiste en un título alto; mientras que, dado que el aborto causado por el serotipo Hardjo es un hecho crónico, la respuesta serológica varía entre animales seronegativos y animales con títulos altos. Además, los animales pueden presentar caída en la producción de leche durante la fase aguda de la infección por Hardjo, asociado a títulos altos (OIE, 2021).

Enzimoimmunoanálisis.- Los ELISA para detectar anticuerpos antileptospiras se han elaborado usando una serie de preparaciones antigénicas diferentes, protocolos de ensayo y programas de ensayo que incluyen pruebas en placa y con tiras reactivas. Las preparaciones de antígeno son preparaciones de células enteras o de la proteína de la membrana externa (OMP), y recientemente se han desarrollado pruebas que utilizan OMP recombinantes. El agente utilizado define la especificidad de la prueba: los ELISA basados en OMP recombinantes son

muy reactivos frente a anticuerpos contra todas las leptospiras patógenas y no tienen valor en estudios epidemiológicos; mientras que, aquellos basados en antígenos lipopolisacáridos son específicos de serogrupo y sí son útiles en estudios epidemiológicos (OIE, 2021).

Los ELISA que funcionan con IgM son útiles en el diagnóstico de la infección aguda. También se han desarrollado ELISA para detectar anticuerpos contra el serotipo Hardjo en leche; sin embargo, los animales vacunados contra este serotipo darán un resultado positivo a estas pruebas (Pritchard, 2001). Aún no se dispone ampliamente de pruebas basadas en OMP, que aunque pueden ser útiles en el diagnóstico de infecciones puntuales, no lo son en programas de control de infecciones adaptadas, en las que los animales no producen respuesta frente a proteínas de la membrana externa, o esta es muy débil, sino que la principal respuesta serológica ocurre contra antígenos polisacáridos de la envoltura externa (Ellis et al., 2000). Una limitación al evaluar la mayoría de ELISA es la validación, pues casi todos se han validado frente a la MAT, que es una prueba imperfecta y tiene una sensibilidad menor al 50 % en algunas infecciones crónicas (OIE, 2021).

4.7.2. Microbiología

Aislamiento de *Leptospira*.- El aislamiento de leptospiras es un método muy específico pero con una sensibilidad baja (Loureiro & Lilenbaum, 2020) que requiere personal experimentado, ausencia de residuos de antibióticos, ausencia de autólisis avanzada del tejido, manejo adecuado y rápido de los tejidos para cultivo y orina con un pH adecuado (OIE, 2021). Si no es posible enviar los tejidos o líquidos inmediatamente al laboratorio, se deben conservar a 2-5 °C para evitar el crecimiento excesivo de otras bacterias y la autólisis; las muestras deben enviarse en un medio de cultivo líquido o en una solución al 1 % de albúmina sérica bovina (BSA) con 5-fluorouracilo a una concentración de 100-200 µg/ml (OIE, 2021).

Las leptospiras deben cultivarse en un medio líquido o semisólido (agar al 0,1–0,2 %) (Zuerner, 2010) con BSA o con Tween 80, como el medio EMJH, o una combinación de Tween 80 y Tween 40 (Ellis, 1986; OIE, 2021). Las leptospiras patógenas son susceptibles a la contaminación (Chideroli et al., 2017) que se puede controlar añadiendo agentes selectivos como 5- fluorouracilo, ácido nalidíxico, fosfomicina y una mezcla de rifampicina, polimixina, neomicina, 5- fluorouracilo, bacitracina y actidiona (Miraglia et al., 2009; Zuerner, 2010); no obstante, estos agentes pueden reducir la posibilidad de aislamiento cuando haya pocas leptospiras viables además de que algunas cepas no crecerán en medios selectivos con múltiples antibióticos (OIE, 2021).

El aislamiento es un procedimiento complejo y largo (Cheuquepán et al., 2020). Los cultivos deben incubarse a una temperatura de 30 ± 2 °C durante 16 a 26 semanas y el tiempo

para la detección de un cultivo positivo depende del serotipo y del número de microorganismos presentes en la muestra; Pomona y Grippotyphosa pueden dar resultados positivos 7–10 días después de la inoculación; mientras que Hardjo y Bratislava pueden tardar mucho más (OIE, 2021). Se debe examinar los cultivos cada 1-2 semanas con un microscopio de campo oscuro y una fuente luminosa de 100 vatios (da Costa Barnabé et al., 2023).

Técnicas de Tinción Inmunoquímicas.- Estas técnicas, que incluyen a la inmunofluorescencia e inmunohistoquímica, permiten poner en evidencia la presencia de leptospiras y son útiles cuando se requiere un diagnóstico rápido o cuando el material patológico no es apto para cultivo. El éxito de estas pruebas depende del número de microorganismos presentes, por lo que son poco apropiadas para diagnosticar el estado de portador crónico donde el número de microorganismos puede ser muy bajo o localizado. Estas pruebas no identifican el serotipo infectante a menos que se utilicen reactivos elaborados especialmente, y por tanto, los resultados deben interpretarse junto a los resultados serológicos (OIE, 2021).

4.7.3. Molecular

Métodos de Detección del Ácido Nucleico.- Las pruebas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ofrecen alta sensibilidad y especificidad y son una herramienta importante de diagnóstico directo para detectar portadores individuales de leptospiras en el ganado (Loureiro & Lilenbaum, 2020). La PCR en tiempo real es más rápida que la PCR clásica y es menos sensible a la contaminación (Picardeau, 2013). Las pruebas se clasifican en dos posibles grupos: aquellas que detectan los genes que están siempre presentes en las bacterias, como *gryB*, *rrs* (gen del ARNr de la subunidad 16S) y *secY*, y aquellas que detectan genes restringidos a especies patógenas de *Leptospira*, como *lipL21*, *lipL32*, *lipL41*, *18iga* y *ligB* (Thaipadungpanit et al., 2011). Estas pruebas no identifican el serotipo infectante, pero algunos grupos de cebadores pueden permitir identificar la especie o cepa si se secuencian los amplicones de la PCR. Los cebadores de la PCR más indicados para usarse en el análisis de muestras animales son los que se basan en el gen *lipL32* (OIE, 2021).

La presencia de inhibidores de la amplificación en las muestras puede causar falsos negativos, especialmente muestras con autólisis o contaminadas con heces. Es importante poner atención al uso de muestras control apropiadas, así como al diseño y volumen de trabajo del laboratorio para prevenir la contaminación de materiales (McCreehy & Callawayth, 1993). El procesamiento de las muestras es determinante por lo que debe ser adecuado para el tejido, líquido y la especie animal (OIE, 2021). La mayoría de protocolos están diseñados para muestras de orina o tejido, pero la PCR se adapta fácilmente a muestras de flujo vaginal, siendo

muy importante para detectar portadores vaginales y estudiar su asociación con trastornos reproductivos (Loureiro & Lilenbaum, 2020).

4.8. Tratamiento

El tratamiento contra la leptospirosis tiene dos objetivos importantes: primero, controlar la infección antes de que el hígado y riñones sufran daños irreparables, y segundo, controlar la leptospiruria de los animales portadores para que puedan permanecer en el grupo (Radostits et al., 2006). Aunque las leptospiras son sensibles a diversos antibióticos, la dihidroestreptomicina sigue siendo el antibiótico más recomendado para el tratamiento de la infección (Loureiro & Lilenbaum, 2020).

Para el tratamiento de la leptospirosis bovina aguda se recomienda la administración de oxitetraciclina (10-25 mg/kg PV, IM, dos veces al día) o dihidroestreptomicina (12,5 mg/kg PV, IM, dos veces al día durante tres días) (Masmela & Gutiérrez, 2021; Radostits et al., 2006). Además, se pueden realizar transfusiones sanguíneas (5-10 l/450 kg PV) a los bovinos con leptospirosis aguda que presenten anemia hemolítica exteriorizada con membranas mucosas pálidas, debilidad y taquicardia (Radostits et al., 2006).

En casos crónicos o endémicos se recomienda tratar simultáneamente a todos los animales susceptibles con dihidroestreptomicina (25 mg/kg PV IM) y vacunar al rebaño para prevenir nuevos casos y evitar que las vacas preñadas aborten (Radostits et al., 2006). Para eliminar el estado de portador renal en bovinos se recomienda una dosis única de dihidroestreptomicina (25 mg/kg PV, IM) (Radostits et al., 2006); sin embargo, en algunos casos se requiere administrar la misma dosis una o dos veces al día durante 3 días (Loureiro & Lilenbaum, 2020). También se pueden utilizar otros antibióticos como oxitetraciclina (20 mg/kg PV, IM); tilmicosina (10 mg/kg PV, SC); y ceftiofur (2,2-5 mg/kg PV, IM una vez al día durante 5 días, o 20 mg/kg PV, IM una vez al día durante 3 días) (Loureiro & Lilenbaum, 2020).

4.9. Control y Prevención

El control de la leptospirosis bovina es importante para prevenir la infección en los animales y reducir las pérdidas económicas que se generan, además de minimizar el riesgo de infección humana por contacto con animales infectados (González & Rivera, 2015). En el caso de infecciones por serovares no adaptados, el control se basa en reducir el contacto entre el ganado vacuno y los animales silvestres o domésticos que actúen como hospedadores de mantenimiento de las distintas serovariedades (García, 2002).

En el caso de infecciones por serovares adaptados, como el serovar Hardjo, el control es complejo y requiere la combinación de diferentes estrategias (García, 2002):

- Tratamiento antibiótico de los animales para eliminar el estado de portador renal y la leptospiruria.
- Vacunación de todos los animales con vacunas que contengan el serovar Hardjo.
- Implementación de medidas higiénico sanitarias en la explotación. Estas incluyen: evitar compartir pastos con el ganado vacuno de otras explotaciones o con el ganado ovino, realizar reposiciones propias o incorporar solo animales de explotaciones cuyo estado sanitario sea conocido, evitar el uso de monta natural y finalmente, limitar el acceso del ganado a fuentes de agua contaminadas.

La detección y eliminación de animales portadores es complicada. Algunos animales positivos a MAT no eliminan leptospiras en la orina, por lo que para determinar su estado como portadores, es necesario repetir el examen de orina para detectar el organismo. En la práctica, los animales serológicamente sospechosos y positivos se consideran portadores y deben sacrificarse o tratarse (Radostits et al., 2006).

Si se logra la erradicación, los animales nuevos deben pasar dos veces una prueba serológica con intervalos de 2 semanas antes de ingresar a la manada. Si es posible, se debe realizar un examen de orina para detectar leptospiras (Radostits et al., 2006); pero si no, se puede administrar una dosis única de dihidroestreptomicina para eliminar un posible estado de portador renal (Adugna, 2016).

Algunas medidas para prevenir la leptospirosis humana causada por contacto con el ganado bovino incluyen: inmunización de los animales, limpieza de cobertizos y patios para evitar aerosoles y salpicaduras de orina en los pisos, drenaje o cercado de áreas húmedas y educación de las personas expuestas al riesgo (veterinarios y trabajadores de granjas y centros de faenamiento) sobre las fuentes de infección y la importancia del uso de ropa de protección (Radostits et al., 2006).

4.10. Epidemiología

La leptospirosis bovina es una enfermedad de distribución mundial que está presente en todos los continentes a excepción de la Antártida (Adler & De la Peña, 2010); sin embargo, hay diferencias en la distribución geográfica de los distintos serovares que pueden afectar al ganado bovino (González & Rivera, 2015).

Se han desarrollado diversos estudios para determinar la frecuencia de infección por *Leptospira* spp. en todo el mundo. En países de América del Norte como Estados Unidos y Canadá, se han reportado seroprevalencias entre 34 y 65 %; mientras que en países de Europa y de Oceanía, como Australia y Nueva Zelanda, las seroprevalencias van entre 25 y 65 % (Fang et al., 2014; Peregrine et al., 2006; Subharat et al., 2012). En África, se ha reportado una

seroprevalencia de 19 % (Dreyfus et al., 2017) y una prevalencia de *Leptospira* spp. del 8,8 % en muestras de riñón y orina de bovinos faenados, hallándose las especies *L. borgpetersenii* y *L. kirschneri* (Alinaitwe et al., 2019). En países de Centroamérica y América Latina como México y Colombia, se han reportado prevalencias de 88.2 % y 35 %, respectivamente, y en el segundo caso, Hardjo fue el serovar más frecuente (Islam et al., 2019; Yepes et al., 2022). Finalmente, en Ecuador se han reportado seroprevalencias de 57,38 % y 74,83 % en las provincias de Manabí y Loja, respectivamente, siendo Pomona el serovar identificado con mayor frecuencia en el primer caso (Burgos, Pérez, Bulnes, et al., 2019; Román et al., 2022).

4.10.1. Factores de Riesgo

Factores Relacionados con el Huésped.- Un factor de riesgo importante es la edad, que se relaciona con el estado de portador renal, así, los terneros son quienes excretan la mayor cantidad de leptospiras en la orina y la mayoría de vacas mayores de tres años no son leptospirúricas (Ellis, 1983).

Factores Relacionados con el Ambiente y el Manejo.- La leptospirosis aparece con mayor frecuencia en zonas con climas tropicales y subtropicales y principalmente en época de lluvias (Valverde et al., 2021). Además, es más frecuente y tiene peor pronóstico en las granjas de leche que en las de carne. Esto se asocia principalmente a 2 factores: 1) el ganado lechero se maneja generalmente bajo sistemas intensivos o semiintensivos que conllevan mayor hacinamiento y favorecen la transmisión de la enfermedad y 2) tras el parto, las crías son separadas de las madres para ser introducidas nuevamente cuando alcanzan su primera gestación; es decir, que hay introducción constante de animales no expuestos, totalmente receptivos a la infección y que pueden infectarse en los momentos de mayor riesgo, haciendo que las tasas de infección más altas se produzcan entre los 2-3 años de edad (Ellis, 1983; Vanegas, 2018).

El manejo sanitario precario de las instalaciones, el hacinamiento de animales, el pastoreo conjunto con ganado infectado u ovejas, el inadecuado control de roedores y otros animales silvestres que contaminan alimentos, suplementos y fuentes de agua y el ingreso de animales cuyo estado sanitario es desconocido son factores que contribuyen con la propagación de la enfermedad (Alonso et al., 2001; Samrot et al., 2021).

5. Materiales y Métodos

5.1. Área de Estudio

La investigación se realizó en el Matadero Municipal del cantón Catamayo, desde el 24 de noviembre hasta el 16 de diciembre del 2022. En este centro de faenamiento se sacrifican bovinos provenientes de todos los cantones de la provincia de Loja. El cantón Catamayo se ubica en la provincia de Loja, al sur del Ecuador. Limita al norte con la provincia de El Oro y con el cantón Loja, al sur con los cantones Gonzanamá y Loja, al este con el cantón Loja y al oeste con los cantones Chaguarpamba y Olmedo. Sus coordenadas geográficas son 3°59'23'' Sur 79°22'09'' Oeste, se encuentra a una altitud de 1 268 m.s.n.m., su temperatura promedio es de 24 °C a 26 °C y el clima es cálido seco en la cabecera cantonal y subtropical húmedo en las parroquias (Municipio de Catamayo, 2022).

5.2. Procedimiento

5.2.1. Enfoque Metodológico

El enfoque metodológico de la investigación fue cuantitativo porque la recolección de datos se basó en la medición y por tanto, los datos se representaron en forma de números y se analizaron estadísticamente (Hernández et al., 2014).

5.2.2. Diseño de la Investigación

El estudio fue de carácter observacional analítico y de corte transversal, para identificar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp. y la presencia de *Leptospira* patógena en muestras de suero y orina, respectivamente, de bovinos faenados en el cantón Catamayo de la provincia de Loja y, además, determinar los factores asociados a la leptospirosis en estos animales.

5.2.3. Tamaño de la Muestra y Tipo de Muestreo

El tipo de muestreo aplicado en esta investigación fue no probabilístico (por conveniencia) con un tamaño de muestra de 100 animales. Este número fue calculado en función de la capacidad de faenamiento del matadero, se muestrearon hasta un promedio de 6 bovinos diarios de lunes a viernes en un periodo de muestreo de 17 días de acuerdo a la planificación académica de la institución.

Para este estudio se tuvieron en cuenta bovinos mayores a 3 años, de cualquier sexo, raza y cantón de procedencia.

5.2.4. Variables de Estudio

La Tabla 2 muestra las diferentes variables del estudio, así como las definiciones, categorías, unidades de medida y los instrumentos de medida de las mismas.

Tabla 2. Caracterización de las variables

Variables	Definición	Categorías	Unidades	Instrumento
Dependiente				
Resultado positivo/negativo en serología y/o PCR para la detección de anticuerpos y de <i>Leptospira</i> patógena	Presencia de anticuerpos y/o de <i>Leptospira</i> patógena	Positivo Negativo	%	Pruebas MAT y PCR
Independientes				
Sexo	Condición orgánica, masculina o femenina, de los animales	Hembra Macho	%	Observación directa
Raza	Grupos en que se subdivide una especie biológica y cuyos caracteres diferenciales se perpetúan por herencia	Carne Leche Doble propósito	%	Observación directa
Edad	Tiempo que ha vivido un animal	3-6 años 6-9 años >9 años	%	Cronología dentaria
Procedencia	Lugar de origen de los animales	Catamayo Otro cantón	%	Registros

5.2.5. Métodos y Técnicas

Registro de Información.- Previo a la toma de muestras clínicas, los animales fueron identificados con códigos que se manejaron en hojas de registro (Anexo 1), en donde además se documentó la fecha de muestreo e información respecto al sexo, raza, edad y cantón de procedencia de los bovinos.

Toma de Muestras de Sangre.- Las muestras de sangre de cada animal se tomaron en tubos vacutainer tapa roja en cantidad de 9 ml a partir de punción de la vena coccígea. Luego fueron numeradas y transportadas a una temperatura aproximada de 4 °C hasta el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la UNL, en donde fueron centrifugadas durante 5 minutos a 1 500 RCF para la obtención de sueros sanguíneos.

Los sueros obtenidos se colocaron por duplicado en tubos eppendorf libres de endonucleasas y se conservaron a -20 °C en el Centro de Biotecnología de la UNL, hasta su envío a los laboratorios de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD) en donde se realizó el diagnóstico serológico de leptospirosis.

Toma de Muestras de Orina.- Las muestras de orina se tomaron mediante punción directa de la vejiga luego de la evisceración de cada animal, en cantidad de 2,5 ml en tubos tipo eppendorf libres de endonucleasas. Las muestras fueron transportadas hacia la UNL en las mismas condiciones previamente descritas para las muestras de sangre.

Las muestras fueron conservadas a -20 °C en el Centro de Biotecnología de la UNL hasta su envío al Laboratorio de *Leptospira* de la Universidad Técnica de Manabí en donde se realizó el diagnóstico de leptospirosis por PCR.

Diagnóstico Serológico.- El suero sanguíneo se sometió al análisis de Aglutinación Microscópica (MAT) de acuerdo a lo sugerido por el manual del código terrestre de la OIE (2021). El proceso se llevó a cabo en los laboratorios de la Dirección de Diagnóstico Animal de AGROCALIDAD.

Se usó un panel de 16 serovares de *Leptospira* (*Icterohaemorrhagiae*, *Pomona*, *Canicola*, *Hardjo*, *Grippityphosa*, *Wolffi*, *Tarassovi*, *Copenhageni*, *Australis*, *Pyrogenes*, *Hebdomadis*, *Cynopteri*, *Autumnalis*, *Saxkoebing*, *Sejroe*, *Bataviae*). La interpretación se realizó mediante la observación de aglutinación bajo microscopio de campo oscuro, considerando un punto de corte de 1/100. Las muestras positivas en la fase de screening se titularon en diluciones dobles hasta un punto final de 1:1600; en el caso de co-aglutinaciones se tomó como positivo el serovar con la titulación más alta (OIE, 2021).

Diagnóstico por PCR convencional.- En el laboratorio, las muestras de orina fueron sometidas a un proceso de estabilización y concentración siguiendo el protocolo establecido por Stoddard (2013). La detección del material genético bacteriano se realizó por PCR convencional para el gen *hap1* de 262 pb, perteneciente a *Leptospira* patógena (reverse primer “TGTTGGGGAAATCATACGAAC”; forward primer “GCAAGCATTACCGCTTGTGG”) (Branger et al., 2005). La amplificación de PCR consistió en un ciclo inicial de 5 min a 95 °C seguida de 45 ciclos de 15 seg a 94 °C, 35 seg a 56 °C y 40 seg a 72 °C; la extensión final fue realizada durante 10 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron cargados en gel de agarosa al 1,5 % teñido con SYBR Safe y cargados con buffer de carga 6X y sometidos a 100 voltios por 40 minutos. Para la visualización a partir de electroforesis, se colocó el gel sobre un transiluminador de luz azul (safe imagen 2.0 Invitrogen) para determinar el peso molecular de las bandas obtenidas del producto de PCR utilizando un marcador de peso molecular de 50 pb.

5.3. Definición de Caso

Se consideró un caso positivo a cualquier animal con resultado positivo en MAT y/o PCR.

5.4. Procesamiento y Análisis de la Información

Las variables se presentaron de forma descriptiva y se usaron frecuencias absolutas y relativas para las variables categóricas. Adicionalmente, se evaluó la asociación entre los factores sexo, raza, edad y procedencia de los animales y la presencia de leptospirosis a través de un análisis bivariado empleando la prueba estadística Chi-cuadrado o Fisher y considerando un nivel de significancia del 5 %. Se emplearon la hoja de cálculo Microsoft Excel versión 2019 y el programa estadístico R versión 4.2.2.

5.5. Consideraciones Éticas

El presente estudio fue de tipo observacional, por lo que no se realizó ninguna intervención o administración de un producto o fármaco en los individuos. En tal sentido, no existieron riesgos o alteraciones en la salud y bienestar para los animales.

6. Resultados

6.1. Características de los Animales Estudiados

Del total de animales muestreados, la mayoría fueron hembras (62 %); casi el total fueron animales de doble propósito (96 %); la mayor parte tuvieron una edad de entre 3-6 años (60 %) y un tercio del total fueron provenientes del cantón Catamayo (34 %) (Tabla 3).

Tabla 3. Características de los bovinos faenados considerados para el estudio (n=100)

Características	N	(%)
Sexo		
Hembra	62	62
Macho	38	38
Raza		
Doble propósito	96	96
Carne	4	4
Edad		
3-6 años	60	60
6-9 años	31	31
> 9 años	9	9
Procedencia		
Calvas	29	29
Catamayo	34	34
Espíndola	1	1
Gonzanamá	3	3
Loja	8	8
Olmedo	20	20
Paltas	3	3
Quilanga	2	2

6.2. Frecuencia de la Infección por *Leptospira* spp.

El 16 % de los animales estudiados fueron positivos a la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp. mediante el análisis MAT; mientras que ningún animal resultó positivo a la presencia de *Leptospira* patógena en orina mediante la prueba PCR (0 %).

Se identificaron ocho serovares circulantes: Hebdomadis, Australis, Autumnalis, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Canicola, Copenhageni y Bataviae. De los 16 animales seropositivos, 2 casos presentaron coaglutinaciones con la misma titulación (Tabla 4).

Tabla 4. Serovares de *Leptospira* circulantes en bovinos faenados en el camal municipal del cantón Catamayo de la provincia de Loja (n=100)

Serovares	Títulos	Animales seropositivos	
		N	%
Hebdomadis	1/100	3	3
	1/200	1	1
Australis	1/100	2	2
	1/400	1	1
Autumnalis	1/100	1	1
	1/400	1	1
Icterohaemorrhagiae	1/100	1	1
Grippotyphosa	1/100	1	1
Canicola	1/400	1	1
Copenhageni	1/100	1	1
Bataviae	1/100	1	1
Hebdomadis-Bataviae	1/100	1	1
Canicola-Bataviae	1/100	1	1
Total		16	16

6.3. Factores Asociados a la Presencia de Anticuerpos por *Leptospira* spp.

Del total de bovinos seropositivos (16), la mayoría fueron hembras, todos fueron de doble propósito, la mayoría tuvieron edades entre 3-6 años y más de un tercio fueron provenientes del cantón Catamayo.

Al no existir casos positivos mediante la técnica de PCR (*hap1*), se emplearon los resultados de serología para realizar el análisis de factores asociados; por lo que los resultados que se muestran a continuación deben ser analizados con precaución.

No existió diferencia significativa ($p > 0,05$) entre la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp. y las variables sexo, raza, edad y cantón de procedencia, por lo que no se consideraron factores asociados a la enfermedad (Tabla 5).

Tabla 5. Características asociadas a seropositivos en el análisis bivariado (n=100)

Características	Negativos (n=84)		Positivos (n=16)		p valor
	N	%	N	%	
Sexo					0,58
Hembra	51	82,26	11	17,74	
Macho	33	86,84	5	13,16	
Raza					1,00
DP	80	83,33	16	16,67	
C	4	100	0	0	
Edad					0,84
3-6	49	81,67	11	18,33	
6-9	27	87,10	4	12,90	
>9	8	88,89	1	11,11	
Procedencia					0,92
Calvas	25	86,21	4	13,79	
Catamayo	27	79,41	7	20,59	
Espíndola	1	100	0	0	

Gonzanamá	3	100	0	0
Loja	7	87,50	1	12,50
Olmedo	17	85,00	3	15,00
Paltas	2	66,67	1	33,33
Quilanga	2	100	0	0

7. Discusión

El 16 % (16/100) de los animales de este estudio fueron positivos a la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp., lo que no coincide con estudios previos desarrollados en el país que han reportado seroprevalencias mayores. En estudios realizados en ganaderías bovinas de las provincias de Loja y Manabí se han obtenido seroprevalencias del 74,83 % y del 56,21 %, respectivamente (Pérez et al., 2020; Román et al., 2022; Román & Chávez, 2016); estas seroprevalencias elevadas podrían deberse a medidas de bioseguridad deficientes así como a la presencia de mamíferos domésticos y silvestres en los establecimientos. Por otro lado, Burgos et al., (2020) reportaron una seroprevalencia alta del 50,9 % en bovinos sacrificados en el cantón Manta; atribuida posiblemente a que la investigación se desarrolló durante los meses lluviosos del año, que favorecen la transmisión de la enfermedad.

Fuera del país se han reportado resultados de 54,2 % en Colombia (Pulido et al., 2017), resultados más bajos en Brasil (Guedes et al., 2019; Pimenta et al., 2019) y resultados del 0% en Chile (Matamala, 2018). Esto demuestra la distribución mundial de la enfermedad y resalta la importancia de implementar medidas de control efectivas para reducir su prevalencia.

El serovar encontrado con mayor frecuencia en este estudio fue Hebdomadis, cuyo hospedador de mantenimiento son los marsupiales (Cilia et al., 2021); llama la atención la alta frecuencia de animales seropositivos a este serovar puesto que no se considera uno de los de mayor circulación en el país (Burgos, Pérez, Bulnes, et al., 2019). En estudios realizados en Ecuador (Burgos et al., 2020; Pérez et al., 2020) y en países vecinos como Colombia (Pulido et al., 2017) se ha reportado la presencia de Pomona e Icterohaemorrhagiae como los serovares más frecuentes en bovinos.

En este estudio también se encontraron, aunque con menos frecuencia, los serovares Australis, Autumnalis, Icterohaemorrhagiae y Copenhageni, cuyos hospedadores de mantenimiento son las ratas; así como también Grippotyphosa, adaptado a los bovinos y marsupiales; y Bataviae y Canicola, cuyos reservorios son los perros (Bharti et al., 2003; Levett, 2001; Zamora & Riedemann, 1999). El hallazgo de anticuerpos contra los serovares citados anteriormente podría atribuirse a la presencia de sistemas de producción extensivos, que permiten el contacto cercano entre los bovinos de este estudio y otros mamíferos domésticos y silvestres, que actúan como hospedadores de mantenimiento de los serovares encontrados y favorecen su transmisión.

El 81,25 % de los animales seropositivos presentaron títulos de anticuerpos de entre 1/100 y 1/200. Resultados similares se obtuvieron por Burgos, Pérez, Bulnes, et al (2019) donde

entre el 70 % y el 100 % de los animales positivos presentaron los mismos títulos de anticuerpos. Estos títulos pueden ser indicativos tanto de infecciones nuevas como de infecciones crónicas; en este estudio se relacionan más a infecciones nuevas puesto que ningún animal fue positivo como portador renal. Por otro lado, el 18,75 % de los bovinos seropositivos presentaron títulos de anticuerpos de 1/400, que pueden sugerir la presencia de infección aguda; sin embargo, para confirmarla es necesario tomar sueros pareados que permitan conocer la dinámica de producción de anticuerpos.

La presencia de *Leptospira* patógena en orina analizada mediante PCR convencional para detección del gen *hap1*, fue del 0 % (0/100) en este estudio. Esto difiere de otras investigaciones en bovinos que han reportado frecuencias de 4,17 % (1/24) (Pimenta et al., 2019) y 14,9 % (31/208) (Guedes et al., 2019) mediante PCR convencional para detección del gen *hap1* de especies patógenas y del gen 16S rRNA de especies patógenas e intermedias patógenas. Es así, que las diferencias entre estudios podrían estar asociadas al gen detectado. Por otro lado, los resultados bajos de este estudio podrían deberse a que la cantidad de leptospirosas patógenas en las muestras fue inferior a la necesaria para su detección mediante PCR convencional. De acuerdo a la OIE (2021), el que no se detecte leptospirosas en la orina no es suficiente para descartar la posibilidad de que un animal sea portador renal crónico y solo indica que este no excretaba cantidades detectables de leptospirosas al momento del examen. Así mismo, este resultado podría sugerir que los animales seropositivos presentaron anticuerpos por vacunación.

Los factores sexo, raza, edad y procedencia de los animales no estuvieron asociados a la presencia de leptospirosis bovina en este estudio. Las investigaciones realizadas para determinar si el sexo es un factor asociado a la infección por *Leptospira* han arrojado resultados contradictorios. Por un lado Vanegas (2018) no encontró asociación entre el sexo y la presencia de la enfermedad; mientras que en un estudio realizado por Guzmán (2017) las hembras muestran mayor seropositividad, esto posiblemente debido a que deben atravesar procesos fisiológicos que inmunosuprimen a los animales como el parto y la lactancia, además de que durante el ordeño y parto están expuestas a la entrada del agente infeccioso por vía percutánea.

Con respecto a la raza, Guzmán (2017) sugiere que las razas lecheras son más susceptibles a la infección frente a las razas de carne y a los animales de doble propósito, debido a que son criadas en sistemas intensivos o semi-intensivos que favorecen la transmisión de las leptospirosas. De forma distinta, Desa et al., (2021) reportaron que la raza no es un factor de asociación.

Para la edad también hay resultados contradictorios. Mientras que para Vanegas (2018), la edad no fue un factor de asociación a la presencia de leptospirosis, para Pérez et al., (2020) y Desa et al., (2021) si lo fue, reportando así una seropositividad mayor entre bovinos mayores de tres años que en aquellos menores. Esto podría deberse a que los animales mayores han estado posiblemente expuestos a la enfermedad y su sistema inmune está más desarrollado. Por otro lado, la edad de los animales parece estar relacionada con el estado de portador renal y se sugiere que en su mayoría, los terneros excretan leptospiras en la orina y las vacas mayores de tres años no son leptospirúricas (Segura et al., 2003).

Finalmente, respecto al lugar de procedencia, Pérez et al., (2020) en una investigación desarrollada en la provincia de Manabí, obtuvieron una mayor seroprevalencia de leptospirosis en uno de los cantones de estudio, reforzando el planteamiento de que la distribución de la leptospirosis depende de las características geográficas y ambientales como la precipitación, humedad relativa, temperatura, altitud y tipo de suelo (Costa et al., 2015).

8. Conclusiones

- La presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp. fue del 16 % (16/100) mediante la prueba de aglutinación microscópica (MAT) y se identificaron anticuerpos contra 8 serovares: Hebdomadis, Australis, Autumnalis, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Canicola, Copenhageni y Bataviae.
- El 0 % (0/100) de los bovinos muestreados fueron positivos a la presencia de *Leptospira* patógena en orina mediante la prueba PCR, esto puede deberse a que los animales no eliminaron bacterias en el momento de la toma de muestra o a que las cantidades de leptospiras patógenas en las muestras fueron inferiores a las requeridas para su detección.
- Las variables sexo, raza, edad y procedencia de los animales no se consideraron factores asociados a la presencia de la enfermedad en los bovinos faenados en el cantón Catamayo de la provincia de Loja.

9. Recomendaciones

- Se recomienda replicar la investigación en el resto de cantones de la provincia de Loja para así ampliar la información epidemiológica de la enfermedad y poder instaurar programas de prevención y control de la misma.
- Colaborar con personal médico autorizado en la vigilancia de la leptospirosis en los grupos de personas en riesgo como las que trabajan en el centro de faenamiento.

10. Bibliografía

- Abdullah, M., Kadivella, M., Sharma, R., Baig, M. S., Faisal, S. M., & Azam, S. (2021). *Comparative analysis of whole genome sequences of Leptospira spp. From RefSeq database provide interspecific divergence and repertoire of virulence factors* (p. 2021.01.12.426470). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.01.12.426470>
- Adler, B., & De la Peña, M. (2010). Leptospira and leptospirosis. *Vet Microbiol*, 140(3-4), 287-296.
- Adler, B., Lo, M., Seemann, T., & Murray, G. L. (2011). Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics. *Veterinary Microbiology*, 153(1-2), 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.02.055>
- Adugna, S. (2016). A Review of Bovine Leptospirosis. *European Journal of Applied Sciences*, 8(6), 347-355. <https://doi.org/10.5829/idosi.ejas.2016.347.355>
- Alinaitwe, L., Kankya, C., Allan, K., Rodriguez, S., Torgerson, P., & Dreyfus, A. (2019). Bovine leptospirosis in abattoirs in Uganda: Molecular detection and risk of exposure among workers. *Zoonoses and Public Health*, 66(6), 636-646. <https://doi.org/10.1111/zph.12616>
- Alonso, C., García, F., Pereira, J., Costas, E., & Ortega, L. (2001). Herd-level risk factors associated with Leptospira spp. Seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 52(2), 109-117. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(01\)00249-5](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(01)00249-5)
- Asensio, V., Haro, B., Herreras, J., & Martín, A. (2018). Unusual ocular clinical manifestation of leptospirosis. *Arch. De La Soc. Española De Oftalmol.*, 93, 342-346.
- Barocchi, M., Ko, A., Galvão, M., McDonald, K., & Riley, L. (2002). Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by Leptospira interrogans, an invasive but nonintracellular pathogen. *Infect. Immun.*, 70, 6926-6932.
- Barragán, S. (2016). *Serovares circulantes del género Leptospira entre bovinos del cantón Loja*. Universidad de Guayaquil.
- Bautista, T. B. R., Bulla, C. D. M., López, B. H. A., Díaz, A. A. M., & Pulido, M. M. O. (2019). Leptospirosis: Enfermedad de importancia en salud pública. *Revista Colombiana de Ciencia Animal recia*, 11(2), 108-118. <https://doi.org/10.24188/recia.v11.n2.2019.727>
- Bertelloni, F., Cilia, G., Turchi, B., Pinzauti, P., Cerri, D., & Fratini, F. (2019). Epidemiology of leptospirosis in North-Central Italy: Fifteen years of serological data (2002–2016).

- Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 65, 14-22.
<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.04.001>
- Bharti, A., Nally, J., Ricaldi, J., Matthias, M., Diaz, M., Lovett, M., Levett, P., Gilman, R., Willig, M., Gotuzzo, E., & Vinetz, J. (2003). Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. *The Lancet. Infectious diseases*, 3(12), 757-771.
- Boey, K., Shiokawa, K., & Rajeev, S. (2019). Leptospira infection in rats: A literature review of global prevalence and distribution. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(8), e0007499. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007499>
- Branger, C., Blanchard, B., Fillonneau, C., Suard, I., Aviat, F., Chevallier, B., & André, G. (2005). Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. *FEMS Microbiology Letters*, 243(2), 437-445. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.01.007>
- Buergelt, C., Clark, E., & Del Piero, F. (2017). *Bovine Pathology, A Text and Color Atlas*. CABI.
- Bulach, D., & Adler, B. (2018). Leptospiral genomics and pathogenesis. En B. Adler, *Current Topics in Microbiology and Immunology* (pp. 189-214). Springer International.
- Burgos, D., Bulnes Goicochea, C. A., Pérez Ruano, M., Revelo Ruales, A. P., Falconí Flores, M. A., Vera Loor, L., Joa Rodríguez, R. A., & Fonseca Rodríguez, O. (2020). Asociación entre la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* y lesiones renales en bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(4), e19028. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i4.19028>
- Burgos, D., Pérez, M., Bulnes, C., Zambrano, M., Sandoval, H. P., Falconi, M., Vera, L., Revelo, A., & Fonseca, O. (2019). *Determinación de la seroprevalencia de Leptospira spp. Y los principales serovares circulantes en el ganado bovino en la provincia de Manabí, Ecuador*. 38(3), 787-800. <https://doi.org/10.20506/rst.38.3.3026>
- Burgos, D., Pérez, M., Goicochea, C., Zambrano, A., Sandoval, H., Falconi, M., Loor, L., Revelo, A., & Fonseca Rodríguez, O. (2019). *Determinación de la seroprevalencia de Leptospira spp. Y los principales serovares circulantes en el ganado bovino en la provincia de Manabí, Ecuador*.
- Cagliero, J., Villanueva, S., & Matsui, M. (2018). Leptospirosis Pathophysiology: Into the Storm of Cytokines. *Front. Cell. Infect. Microbiol*, 8, 204:1-204:8.
- Cheuquepán, F., Recavarren, M., Quintana, S., Cantón, G., Odeón, A., Marin, M., & Morrell, E. (2020). Improvement of *Leptospira* spp. Diagnosis in aborted bovine fetuses by

- qPCR. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 73, 101555. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101555>
- Chideroli, R., Goncalves, D., Suphoronski, S., Alfieri, A., Alfieri, A., de Oliveira, A., de Freitas, J., & Pereira, U. (2017). *Culture strategies for isolation of fastidious Leptospira serovar Hardjo and molecular differentiation of genotypes Hardjobovis and Hardjoprajitno*. 8, 2155. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02155>
- Cilia, G., Bertelloni, F., Albini, S., & Fratini, F. (2021). Insight into the Epidemiology of Leptospirosis: A Review of Leptospira Isolations from “Unconventional” Hosts. *Animals (Basel)*, 11(1), 191. <https://doi.org/10.3390/ani11010191>
- Correia, L., Loureiro, A. P., & Lilenbaum, W. (2017). Effects of rainfall on incidental and host-maintained leptospiral infections in cattle in a tropical region. *The Veterinary Journal*, 220, 63-64. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.12.016>
- Cosate, M., Sakamoto, T., de Oliveira, T., Moreira, É., Regis da Silva, C. G., Brasil, B., Oliveira, C., Ariston, V., Ortega, J., Leite, R., & Haddad, J. (2017). Molecular typing of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo isolates from leptospirosis outbreaks in Brazilian livestock. *BMC Veterinary Research*, 13(177). <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1081-9>
- Costa, F., Hagan, J. E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M. S., Stein, C., Abela-Ridder, B., & Ko, A. I. (2015). Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(9), e0003898. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>
- da Costa Barnabé, N., Rodriguez, R., Silva, D., Batista, D., Ribeiro da Costa, F. T. R. da, Araújo, J., Dantas, C., Ullmann, L., da Costa, D., Rodrigues, M., Higino, S. S. dos S., Batista, C., de Azevedo, S., & Alves, C. (2023). Bovine Leptospirosis in Caatinga Biome, Brazil: New Insights into Diagnosis and Epidemiology. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(3), 177. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8030177>
- de Buen de Arguero, N. (2001). *Citología Diagnostica Veterinaria* (1.^a ed.). Manual Moderno.
- Delooz, L., Czaplicki, G., Gregoire, F., Dal Pozzo, F., Pez, F., Kodjo, A., & Saegerman, C. (2018). Serogroups and genotypes of *Leptospira* spp. Strains from bovine aborted foetuses. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(1), 158-165. <https://doi.org/10.1111/tbed.12643>
- Desa, G., Deneke, Y., Begna, F., & Tolosa, T. (2021). Seroprevalence and Associated Risk Factors of *Leptospira interrogans* Serogroup Sejroe Serovar Hardjo in Dairy Farms in

- and around Jimma Town, Southwestern Ethiopia. *Veterinary Medicine International*, 2021, 6061685. <https://doi.org/10.1155/2021/6061685>
- Dreyfus, A., Odoch, T., Alinaitwe, L., Rodriguez, S., Tsegay, A., Jaquier, V., & Kankya, C. (2017). Cross-Sectional serological survey for leptospira spp. In beef and dairy cattle in two districts in Uganda. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(11). <https://doi.org/10.3390/ijerph14111421>
- Ellis, W. (1983). Recent developments in bovine Leptospirosis. *Vet. Annu*, 91-95.
- Ellis, W. (1986). The diagnosis of Leptospirosis in farm animals. En W. Ellis & T. Little, *Present state of Leptospirosis diagnosis and control*. (pp. 13-31). Martinus Nijhoff Publishers.
- Ellis, W. (2015). Animal Leptospirosis. En B. Adler (Ed.), *Leptospira and Leptospirosis, Current Topics in Microbiology and Immunology* (pp. 99-137). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Ellis, W., Yan, K., McDowell, S., Mackie, D., Pollock, J., & Taylor, M. (2000). *Immunity to Bovine Leptospirosis*. Actas del XXI Congreso Mundial de Buiatría, Uruguay.
- Faine, S., Adler, B., Bolin, C., & Perolat, P. (1999). A brief history of leptospirosis. En *Leptospira and leptospirosis* (Segunda, pp. 1-9). Medisci Press.
- Fang, F., Collins, J., Cullum, A., Heuer, C., Wilson, P., & Benschop, J. (2014). Shedding and seroprevalence of pathogenic Leptospira spp in sheep and cattle at a New Zealand abattoir. *Zoonoses Public Health*, 62, 258-268. <https://doi.org/10.1111/zph.12146>
- Fávero, J., de Araújo, H., Lilenbaum, W., Machado, G., Tonin, A., Baldissera, M. D., Stefani, L., & Da Silva, A. S. (2017). Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. *Microbial Pathogenesis*, 107, 149-154. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.032>
- Follmer, A., Travería, G., & Baltian, L. (2017). *Estudio Retrospectivo de Leptospirosis en Fetos Bovinos en la Provincia de La Pampa*. Univerisdad Nacional de La Plata.
- García, F. (2002). Tratamiento y control de la leptospirosis bovina. *Bovis*, 106, 77-95.
- Góngora, A. G., Parra, J., & Sarmiento, L. (2022). Bovine leptospirosis: Effects on reproduction and an approach to research in Colombia. *Tropical Animal Health and Production*, 54(251). <https://doi.org/10.1007/s11250-022-03235-2>
- González, F., & Rivera, S. (2015). Caracterización de la leptospirosis bovina en Venezuela. Revisión breve sobre la enfermedad. *REDVET*, 16(2), 1-22.
- Guedes, I., Araújo, S., de Souza, G., de Souza, S., Taniwaki, S., Cortez, A., Brandão, P., & Heinemann, M. (2019). Circulating Leptospira species identified in cattle of the

- Brazilian Amazon. *Acta Tropica*, 191, 212-216.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.01.011>
- Guzmán, L. (2017). *Seroprevalencia y factores de riesgo de la infección por agentes reproductivos del ganado bovino (Brucella spp., Coxiella burnetii, Leptospira interrogans serovar Hardjo y Neospora caninum) en explotaciones lecheras y de doble propósito de Ecuador* [Tesis doctoral, Universidad de Córdoba].
<http://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/15109>
- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, M. (2014). *Metodología de la Investigación* (Sexta). Mc Graw Hill Education.
- Ibrahim, N., Alrashdi, B., Elnaker, Y., Elmahallawy, E., Alblihed, M., Daib, M., Abd, A., Abo, E., Badawy, B., & Elbaz, E. (2022). Serological Investigation and Epidemiological Analysis of Bovine Leptospirosis in Egypt. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 7(9), 208. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7090208>
- Instituto Nacional de Salud. (2000). *Leptospirosis. Módulos Técnicos. Serie Documentos Monográficos No. 2*. Ministerio de Salud.
- Islam, A., Ijaz, M., Hussain, S., Shoaib, M., Fakhar, M., & Yasmeen, K. (2019). Leptospirosis: Rising Nuisance for Cattle and Threat to Public Health. En *Bacterial Cattle Diseases*. IntechOpen.
- Jiménez, Z. (2011). *Enfermedades que afectan la reproducción bovina en Colombia, no sujetas a control oficial* (1.ª ed.). ICA Instituto Colombiano Agropecuario.
- Johnson, D. (2018). *Leptospira spp.* En *Bacterial Pathogens and Their Virulence Factors* (pp. 289-294). Springer International.
- Krieg, N., Staley, J., Brown, D., Hedlund, B., Paster, B., Ward, N., Ludwig, W., & Whitman, W. (Eds.). (2010). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Segunda, Vol. 4). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68572-4>
- Lau, C., Townell, N., Stephenson, E., van den Berg, D., & Craig, S. (2018). Leptospirosis: An important zoonosis acquired through work, play and travel. *Aust. J. Gen. Pract.*, 47, 105-110.
- Levett, P. (2001). Leptospirosis. *Clinical microbiology reviews*, 14(2), 293-326.
- Libonati, H., Santos, G., Souza, G., Brandao, F., & Lilenbaum, W. (2018). *Leptospirosis is strongly associated to estrus repetition on cattle*. 50, 1625-1629.
- Loureiro, A., & Lilenbaum, W. (2020). Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. *Theriogenology*, 141, 41-47.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.011>

- Masmela, R., & Gutiérrez, C. (2021). *Leptospirosis Bovina Enfocada en el Potencial Zoonótico, Alternativas de Control y Tratamiento*. Seminario de profundización sobre enfermedades infecciosas en Medicina veterinaria y zootecnia, Ibagué.
- McCreeedy, B., & Callawayth, H. (1993). Laboratory design and work flow. En D. Persing, T. Smith, F. Tenover, & T. White, *Diagnostic Molecular Microbiology. Principals and Applications* (pp. 149-159). American Society for Microbiology.
- Miraglia, F., De Moraes, Z., Melville, P., Dias, R., & Vasconcellos, S. (2009). Emjnh medium with 5-fluorouracil and nalidixic acid associated with serial dilution technique used to recover leptospira spp from experimentally contaminated bovine semen. *Braz. J. Microbiol*, 40, 189-193.
- Mori, M., Vannoorenberghe, P., Bakinahe, R., Maris, J., de Jong, E., Tignon, M., Marin, M., Desqueper, D., Fretin, D., & Behaeghel, I. (2017). *Reproductive disorders and Leptospirosis: A case study in a mixed-species farm (cattle and swine)*. 4, E64.
- Municipio de Catamayo. (2022). *Catamayo*. <https://catamayo.gob.ec/catamayo-2/>
- Nally, J., Hornsby, R., Alt, D., Bayles, D., Wilson, J., Palmquist, D., & Bauer, N. (2018). Isolation and characterization of pathogenic leptospire associated with cattle. *Veterinary Microbiology*, 218, 25-30. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.023>
- Nascimento, A., Ko, A., Martins, E., Monteiro, C., Ho, P., Haake, D., Verjovski, S., Hartskeerl, R., Marques, M., & Oliveira, M. (2004). Comparative Genomics of Two *Leptospira interrogans* Serovars Reveals Novel Insights into Physiology and Pathogenesis. *J. Bacteriol.*, 186, 2164-2172.
- OIE. (2021). Capítulo 3.1.12. Leptospirosis. En *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2021* (Vol. 1). OIE.
- OMS. (2008). *Leptospirosis Humana: Guía para el Diagnóstico, Vigilancia y Control*.
- Orjuela, A. G., Parra-Arango, J. L., & Sarmiento-Rubiano, L. A. (2022). Bovine leptospirosis: Effects on reproduction and an approach to research in Colombia. *Tropical Animal Health and Production*, 54(5), 251. <https://doi.org/10.1007/s11250-022-03235-2>
- Peregrine, A., Martin, W., Hopwood, D., Duffield, T., McEwen, B., Hobson, J., & Hietala, S. (2006). Neospora caninum and *Leptospira* serovar serostatus in dairy cattle in Ontario. *Can Vet J* 47: 467-470., 47, 467-470.
- Pérez, M., Burgos, D., Bulnes, C., Zambrano, M., Sandoval, H., Falconi, M., Vera, L., Revelo, A., & Fonseca, O. (2020). Seroprevalence and risk factors of bovine leptospirosis in the province of Manabí, Ecuador. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 72, 101527. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101527>

- Picardeau, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 43, 1-9.
- Pimenta, C., da Costa, D., Silva, M., Pereira, H., Júnior, J., Malossi, C., Ullmann, L., Alves, C., & de Azevedo, S. S. (2019). Strategies of the control of an outbreak of leptospiral infection in dairy cattle in Northeastern Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 51(1), 237-241. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1635-2>
- Pritchard, G. (2001). Milk antibody testing in cattle. *In Practice*, 23, 542-548.
- Pulido, M., Díaz, A., & Giraldo, J. (2017). Determinación de *Leptospira* spp. En humanos y bovinos pertenecientes al municipio de Toca, Boyacá. *Revista Veterinaria y Zootecnia (On Line)*, 11(2), Article 2. <https://doi.org/10.17151/vetzo.2017.11.2.5>
- Radostits, O., Gay, C., Hinchcliff, K., & Constable, P. (2006). *VETERINARY MEDICINE A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats* (Décima). SAUNDERS.
- Rajeev, S., Shiokawa, K., Llanes, A., Rajeev, M., Restrepo, C., Chin, R., Cedeño, E., & Ellis, E. (2020). Detection and Characterization of *Leptospira* Infection and Exposure in Rats on the Caribbean Island of Saint Kitts. *Animals*, 10(2), 350. <https://doi.org/10.3390/ani10020350>
- Revelo, A., De La Torre M., E., Martínez, G., Baquero, M., & Casart, Y. (2020). Evaluación de métodos de extracción de ADN genómico para la identificación de *Leptospira* spp en muestras de orina bovina mediante PCR. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(2), e15522. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i2.15522>
- Rocha, B., Balaro, M., Pereira, P., Martins, G., & Lilenbaum, W. (2018). Chronic experimental genital leptospirosis with autochthonous *Leptospira santarosai* strains of serogroup Sejroe. *Small Ruminant Research*, 164, 28-31. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.04.015>
- Román, F., Chavez, K., & Chávez, R. (2016). Identificación molecular de *Leptospira* spp., presente en el ganado lechero del cantón Loja-Ecuador. *Revista Centro de Biotecnología*, 5(1), 62-71.
- Román, F., & Chávez, R. (2016). Prevalencia de enfermedades que afectan la reproducción en ganado Bovino Lechero del cantón Loja. *CEDAMAZ*, 6(1), Article 1.
- Román, F., Chávez, R., & Luna, J. (2014). Determinación de anticuerpos leptospirales en bovinos y en personal vinculado a la ganadería. *Centro de Biotecnología*, 3(1).
- Román, F., Cordero, F., Mora, A., & Ramón, P. (2022). Seroprevalencia a *Leptospira* spp. Y *Neospora caninum* en ganaderías del cantón Loja. *Perfiles*, 28(1), 52-58. <https://doi.org/10.47187/perf.v1i28.182>

- Samrot, A., Sean, T., Bhavya, K., Sahithya, C., Chan-Drasekaran, S., Palanisamy, R., Robinson, E., Subbiah, S., & Mok, P. (2021). Leptospirosis Infection, Pathogenesis and Its Diagnosis—A Review. *Pathogens*, *10*(2), 145. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020145>
- Segura, V., Solis, J., & Segura, J. (2003). Seroprevalence of and risk factors for leptospiral antibodies among cattle in the state of Yucatan, Mexico. *Trop Anim Health Prod*, *35*(4), 293-299.
- Soares, P., Gomes, D., Macedo, F. P., Soares, M., Lemes, K. R., Jaeger, L., Lilenbaum, W., & Lima, A. (2020). Serological and molecular characterization of *Leptospira kirschneri* serogroup Grippotyphosa isolated from bovine in Brazil. *Microbial Pathogenesis*, *138*, 103803. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103803>
- Stoddard, R. A. (2013). Detection of Pathogenic *Leptospira* spp. Through Real-Time PCR (qPCR) Targeting the LipL32 Gene. En M. Wilks (Ed.), *PCR Detection of Microbial Pathogens* (Vol. 943, pp. 257-266). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-353-4_17
- Subharat, S., Wilson, P., Heuer, C., & Collins, J. (2012). Longitudinal serological survey and herdlevel risk factors for *Leptospira* spp serovars hardjo-bovis and pomona on deer farms with sheep and/or beef cattle. *60*, 215-222. <https://doi.org/10.1080/00480169.2012.663323>
- Thaipadungpanit, J., Chierakul, W., Wuthiekanun, V., Limmathurotsakul, D., Amornchai, P., Boonslip, S., Smythe, L., Limpai boon, R., Hoffmaster, A., Day, N., & Peacock, S. (2011). Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and lipL32 genes for human Leptospirosis in Thailand: A casecontrol study. *Plos One*, *6*.
- Trigo, F. (2011). *Patología Sistémica Veterinaria* (5.^a ed.). McGraw Hill.
- Valverde, F. X., Yunga, A. X., Ortega, V. Y., & Zamora, A. R. (2021). Incidence, prevalence and identification of risk factors associated with leptospira infection. *7*(4), 152-172.
- Vanegas, M. (2018). *Incidencia, prevalencia y la identificación de factores de riesgo asociados a la infección por Leptospira interrogans, serovariedad Hardjo, en ganado bovino en el Centro de Investigación Turipaná en el municipio Cereté departamento de Córdoba*. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales.
- Vincent, A., Schiettekatte, O., Goarant, C., Neela, V., Bernet, E., Thibeaux, R., Ismail, N., Khalid, M., Amran, F., Masuzawa, T., Nakao, R., Korba, A., Bourhy, P., Veyrier, F., & Picardeau, M. (2019). Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the

- genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(5), e0007270. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>
- Yepes, E., Álvarez, A., & Contreras, A. (2022). *Seroprevalencia de rinotraqueitis infecciosa bovina, diarrea viral bovina y leptospirosis en toros reproductores de predios*. Universidad CES.
- Zachary, J. (2016). *Pathology basic of veterinary diseases* (6.^a ed.). Elsevier.
- Zamora, J., & Riedemann, S. (1999). Animales silvestres como reservorios de leptospirosis en Chile: Una revisión de los estudios efectuados en el país. *Archivos de medicina veterinaria*, 31(2), 151-156. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X1999000200001>
- Zhang, L., Zhang, C., Ojcius, D., Sun, D., Zhao, J., Lin, X., Li, L., & Yan, J. (2012). The mammalian cell entry (Mce) protein of pathogenic *Leptospira* species is responsible for RGD motif-dependent infection of cells and animals. *Mol. Microbiol.*, 83, 1006-1023.
- Zuerner, R. (2010). Family iV. Leptospiraceae. En N. Krieg, J. Staley, D. Brown, B. Hedlund, B. Paster, N. Ward, W. Ludwig, & W. Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Segunda, Vol. 4).

11. Anexos

Anexo 1. Hoja de registro

Detección de *Leptospira* spp. en bovinos en el centro de faenamiento del cantón Catamayo de la provincia de Loja

Dannia Belén Esparza Chamba

Código de la investigación	Código de matadero	Fecha de muestreo	Sexo Hembra Macho	Raza	Edad	Procedencia Catamayo Otro Cantón	Observaciones
				Carne Leche Doble propósito			
1					3-6		
2					6-9		
3					>9		
4							
...							
...							
...							
...							
100							

Anexo 2. Certificado de traducción del resumen

English Speak Up Center

Nosotros "English Speak Up Center"

CERTIFICAMOS que

La traducción del resumen de tesis "DETECCIÓN DE LEPTOSPIRA SPP. EN BOVINOS EN EL CENTRO DE FAENAMIENTO DEL CANTÓN CATAMAYO DE LA PROVINCIA DE LOJA." documento adjunto solicitado por la señorita Dannia Belén Esparza Chamba con cédula de ciudadanía número 1900853910 ha sido realizada por el Centro Particular de Enseñanza de Idiomas "English Speak Up Center"

Esta es una traducción textual del documento adjunto. El traductor es competente y autorizado para realizar traducciones.

Loja, 30 de mayo de 2023

Elizabeth Sánchez de Alarcón
Mg. Sc. Elizabeth Sánchez Burneo
DIRECTORA ACADÉMICA

English Speak Up Center

DIRECCIÓN: SUCRE 207, 45 ENTRE AZUAY Y MIGUEL RIVERA | TELÉFONO: 099 5283264