



Universidad
Nacional
de Loja

Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

Maestría de Sanidad Animal

Detección de *Leptospira* patógena en hembras bovinas de edad reproductiva en la provincia de Morona Santiago

Trabajo de Titulación previo a la
obtención del título de Magister en
Sanidad Animal.

AUTOR:

Danilo Ismael Arévalo Torres

DIRECTOR:

Dra., Elena Carolina Serrano Recalde, PhD.

Loja – Ecuador

2022

Certificación

Loja, 16 de junio de 2023

Dra. Elena Carolina Serrano Recalde, PhD

DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

CERTIFICO:

Que he revisado y orientado todo el proceso de la elaboración del Trabajo de Titulación denominado: **Detección de *Leptospira* patógena en hembras bovinas de edad reproductiva en la provincia de Morona Santiago**, de autoría del estudiante **Danilo Ismael Arévalo Torres** previo a la obtención de título de **Magister en Sanidad Animal**, con cédula de identidad **Nro. 0104729165**, una vez que el trabajo cumple con todos los requisitos exigidos por la Universidad Nacional de Loja, para el efecto, autorizo la presentación para la respectiva sustentación y defensa.

Dra. Elena Carolina Serrano Recalde, PhD

DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Autoría

Yo, **Danilo Ismael Arévalo Torres**, declaro ser autor del presente Trabajo de Titulación 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 Titulación, en el Repositorio Digital Institucional - Biblioteca Virtual.

Firma:

Autor: Danilo Ismael Arévalo Torres

Cédula de identidad: 0104729165

Fecha: Loja, 16 de junio de 2023

Correo electrónico: danilo.arevalo@unl.edu.ec

Celular: 0968238334

Carta de autorización por parte del autor, para consulta, reproducción parcial o total y/o publicación electrónica del texto completo, del Trabajo de Titulación.

Yo, **Arévalo Torres Danilo Ismael**, declaro ser autor del Trabajo de Titulación denominado: **Detección de *Leptospira* patógena en hembras bovinas de edad reproductiva en la provincia de Morona Santiago**, como requisito para optar el título de **Magister en Sanidad Animal**, 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 de la siguiente manera en el Repositorio Institucional.

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

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

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los dieciséis días del mes de junio de dos mil veinte y tres.

Firma:

Autor: Danilo Ismael Arévalo Torres

Cédula: 0104729165

Dirección: Edmundo Carvajal y Rosendo Alvear

Correo electrónico: danilo.arevalo@unl.edu.ec

Teléfono: 0968238334

DATOS COMPLEMENTARIOS:

Directora Del Trabajo De Titulación: Dra. Elena Carolina Serrano Recalde, PhD

Dedicatoria

Mi Trabajo de Titulación se lo dedico a mi querida familia, a mi mamá Cruz Guillermina, hermanos y hermanas por siempre brindarme palabras de aliento, a mi esposa Alexandra por su apoyo incondicional, a mis hijos Pablo y Deyra por ser siempre el motivo de mi superación.

Danilo Ismael Arévalo Torres

Agradecimiento

A mi familia por todo su apoyo durante el desarrollo de la maestría, que con la motivación de ellos pude alcanzar la meta trazada.

Agradezco a la Universidad Nacional de Loja por darme la oportunidad superarme y obtener título de cuarto nivel.

Al Gobierno Autónomo Descentralizado del cantón Gualaquiza, por permitir el desarrollo de la investigación en el camal Municipal.

Al personal que labora en el camal Municipal del cantón Gualaquiza por su apoyo y facilidades brindadas durante el tiempo que se realizó la toma de muestras.

Agradezco a todos los docentes de la maestría de Sanidad Animal que brindaron sus conocimientos de manera virtual o presencial en las aulas, de manera especial a la Dra Jhuliana Luna por su paciencia y tiempo al ser mí guía en el desarrollo de esta investigación.

Danilo Ismael Arévalo Torres

Índice de Contenidos

Portada	i
Certificación	ii
Autoría	iii
Carta de autorización	iv
Dedicatoria	v
Agradecimiento	vi
Índice de Contenidos	vii
Índice de tablas	x
Índice de figura	xi
Índice de anexos	xii
1. Título	1
2. Resumen	2
2.1 Abstract.....	3
3. Introducción	4
4. Marco teórico	6
4.1 Definición e importancia de la leptospirosis.	6
4.2 Etiología.....	6
4.2.1 Clasificación taxonómica de <i>Leptospira</i> spp.	6
4.2.2 Clasificación serológica	6
4.2.3 Clasificación genotípica.....	7
4.3 Características morfológicas, estructurales y microbiológicas de <i>Leptospira</i> spp.	7
4.4 Transmisión	9
4.5 Patogenia y Respuesta Inmunitaria.....	10
4.6 Signos clínicos y lesiones	10
4.7 Diagnóstico	12

4.7.1	Diagnóstico clínico	12
4.7.2	Técnicas serológicas para detección de anticuerpos	12
4.7.3	Otras pruebas serológicas	13
4.7.4	Detección molecular del agente	13
4.7.5	Aislamiento del agente.....	15
4.8	Control y prevención de la enfermedad.....	15
4.9	Tratamiento.....	16
4.10	Epidemiología.....	17
5.	Metodología	18
5.1	Lugar de ejecución y período	18
5.2	Diseño de la investigación.....	19
5.3	Tamaño de la muestra y tipo de muestreo	19
5.4	Registro de información de campo	19
5.5	Toma, transporte y conservación de muestras biológicas	19
5.6	Detección de anticuerpos y determinación de serovares mediante aglutinación microscópica (MAT).....	19
5.7	Detección de <i>Leptospira</i> spp. mediante PCR convencional	20
5.8	Definición de caso	20
5.9	El análisis estadístico.....	20
6.	Resultados.....	22
6.1	Características de los animales estudiados	22
6.2	Resultados del diagnóstico serológico de leptospirosis en hembras bovinas faenadas en el cantón Gualaquiza	22
6.3	Resultados del diagnóstico mediante PCR convencional.....	22
7.	Discusión.....	24
7.1	Diagnóstico serológico	24
7.2	Detección de <i>Leptospira</i> patógena	25

8. Conclusiones	27
9. Recomendaciones.....	28
10. Bibliografía.....	29
11. Anexos	38

Índice de tablas:

Tabla 1. Representación de serogrupos y serovares de algunas especies animales	6
Tabla 2. Tipos de PCR utilizados para diagnóstico de leptospirosis en algunas investigaciones.....	15
Tabla 3. Antibioticos para el tratamiento de leptospirosis bovina	17
Tabla 4. Leptospira en estado de infección por medio de detección molecular PCR.	23

Índice de figuras:

Figura 1. Morfología de <i>Leptospira</i> spp.....	8
Figura 2. Estructura de la membrana celular de <i>Leptospira</i> spp.	8
Figura 3. Representación gráfica de la parroquia Gualaquiza, cantón Gualaquiza, provincia de Morona Santiago.	18

Índice de anexos:

Anexo 1. Identificación de toma de muestras	38
Anexo 2. Identificación de resultados de laboratorio	39
Anexo 3. Informe de análisis de laboratorio	40
Anexo 4. Informe de análisis de laboratorio	41
Anexo 5. Certificación de traducción del abstract	42

1. Título

Detección de *Leptospira* patógena en hembras bovinas de edad reproductiva en la provincia de Morona Santiago.

2. Resumen

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica, causada por cualquier agente patógeno del género *Leptospira*, además es considerada como una enfermedad reproductiva que provoca elevadas pérdidas económicas en la ganadería bovina debido a abortos, infertilidad, disminución de la producción láctea y muerte de animales. Estudios serológicos realizados en el Ecuador han demostrado la circulación frecuente de serovares como: Pomona, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Canicola, Bataviae, Hardjo, Australis, Sejroe, entre otros; sin embargo, las limitaciones de la serología hacen necesario el uso de técnicas moleculares para la detección del patógeno y sus sitios de colonización. En la provincia de Morona Santiago, no existen estudios relevantes sobre la detección de *Leptospira* patógena, por lo que se desconoce el impacto de la leptospirosis, de manera especial en la salud reproductiva de los animales; en consecuencia, el presente estudio buscó identificar la presencia del patógeno en hembras bovinas de edad reproductiva en el cantón, mediante un estudio observacional de tipo transversal en el camal municipal del cantón Gualaquiza. Se muestrearon 50 hembras bovinas para la obtención de suero sanguíneo, orina y lavado uterino con el fin de diagnosticar leptospirosis mediante MAT (aglutinación microscópica) y PCR convencional (gen *hap 1*). Se detectó *Leptospira* patógena en el 8 % de los animales estudiados, por lo que se sugiere a los ganaderos y personal de la zona de estudio se instauren medidas de bioseguridad necesarias para reducir la transmisión en las poblaciones de animales y hacia el ser humano.

Palabras claves: Leptospirosis genital; *hap 1*; enfermedad abortiva; MAT

2.1 Abstract

Leptospirosis is a zoonotic disease caused by any pathogenic agent of the genus *Leptospira*. It is also considered a reproductive disease that causes high economic losses in cattle farming due to abortions, infertility, decreased milk production and death of animals. Serological studies carried out in Ecuador have shown the frequent circulation of serovars such as: Pomona, Icterohaemorrhagiae, Grippityphosa, Canicola, Bataviae, Hardjo, Australis, Sejroe, among others; however, the limitations of serology make necessary the use of molecular techniques for the detection of the pathogen and its colonization sites. In the province of Morona Santiago, there are no relevant studies on the detection of pathogenic *Leptospira*, so the impact of leptospirosis, especially on the reproductive health of animals, is unknown; consequently, the present study sought to identify the presence of the pathogen in bovine females of reproductive age in the canton, through a cross-sectional observational study in the municipal animal feedlot of Gualaquiza canton. Fifty female cattle were sampled to obtain blood serum, urine and uterine lavage in order to diagnose leptospirosis by MAT (microscopic agglutination) and conventional PCR (*hap 1* gene). Pathogenic *Leptospira* was detected in 8% of the animals studied. Therefore, it is suggested that farmers and personnel in the study area implement the necessary biosecurity measures to reduce transmission in animal populations and to humans.

Keywords: genital leptospirosis; *hap 1*; abortive disease; MAT.

3. Introducción

La infección por *Leptospira* patógena en bovinos produce un impacto reproductivo en los animales a consecuencia de la colonización renal y uterina; causa un alto impacto económico por las pérdidas de producción de los hatos ganaderos debido a la presentación de signos como: fiebre, anemia hemolítica aguda con hemoglobinuria, abortos, infertilidad, disminución de la producción láctea y muerte, además constituye un riesgo para las personas que laboran en el manejo de los animales (Boey et al., 2019; Figueredo et al., 2017; Koval et al., 2020).

Los roedores son los principales reservorios y agentes diseminadores del patógeno, mientras que los hospederos accidentales en donde se desarrolla la enfermedad son la mayoría mamíferos incluido el ser humano; en los bovinos se puede presentar de forma aguda, subaguda o crónica (Pacheco, 2015; Zeni, 2018). Cada serovariedad de la bacteria está adaptada a determinados hospedadores mamíferos (Pacheco, 2015), siendo los bovinos hospedadores naturales de *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo (Hardjobovis), y *Leptospira interrogans* serovar Hardjo (Hardjoprajitno) que pueden colonizar y mantenerse en el tracto genital de vacas y toros infectados (da Silva et al., 2019); sin embargo, como ocurre con otras especies puede existir la presencia de otros serovares incidentales con consecuencias clínico patológicas más severas (Ramos, Cruz, et al., 2019; Monroy et al., 2020).

Las personas y animales pueden estar expuestos a la bacteria por contacto directo o indirecto con la orina de animales infectados. El contagio puede darse también por la vía vertical, de la madre al feto o al neonato a través de transmisión transplacentaria o transmamaria, respectivamente, así como también por vía sexual dentro de las especies (Boey et al., 2019); en los bovinos se consideraba la infección del tracto genital un efecto secundario de la infección renal; sin embargo, la leptospirosis genital debe considerarse como un síndrome específico, en donde algunas cepas, del serogrupo Sejroe, colonizan el tracto genital (Loureiro & Lilienbaum, 2020a).

El diagnóstico de la enfermedad es complicado, sobre todo considerando la inespecificidad de los signos clínicos aún en infecciones incidentales. El método “Gold-standard” para el diagnóstico es el Test de Micro Aglutinación (MAT) basado en la detección y titulación de anticuerpos producidos contra los antígenos de los serovares (Samrot et al., 2021). Sin embargo, dadas las limitaciones en la sensibilidad de la prueba, es necesario recurrir a técnicas más sensibles y específicas que permitan la detección del agente en los diferentes órganos, con el fin de establecer el impacto sobre la salud del individuo y las poblaciones

susceptibles a la infección. Actualmente se han desarrollado protocolos de diagnóstico mediante PCR con alta sensibilidad y especificidad (Hamer et al., 2019a). cuya mayor ventaja radica en que es posible detectar el ADN incluso cuando las bacterias no son viables (Grune et al., 2021).

En estudios realizados en diferentes localidades del Ecuador las serovariedades identificadas con mayor frecuencia han sido, por ejemplo, en Manabí: Pomona, Icterohaemorrhagiae, Grippytyphosa (Burgos et al., 2019); Loja: Canicola y Bataviae (Luna et al., 2019); Chimborazo: Canicola, Hardjo y Pomona (Ordóñez et al., 2021); El Pangui: Australis, Sejroe y Bataviae (Muyulema, 2020).

Al considerarse una enfermedad subdiagnosticada con consecuencias serias en la salud reproductiva de los animales, que puede generar un alto impacto económico en las ganaderías de la provincia de Morona Santiago y graves problemas de salud pública, para el presente estudio se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Realizar diagnóstico serológico para *Leptospira* spp. en hembras bovinas en edad reproductiva.
- Detectar *Leptospira* patógena en orina y muestras uterinas en hembras bovinas en edad reproductiva.
- Determinar la relación del serovar infectante de *Leptospira* con la colonización renal y uterina.

4. Marco teórico

4.1 Definición e importancia de la leptospirosis.

La leptospirosis es la enfermedad zoonótica más extendida en todo el mundo, tiene un impacto significativo tanto en la salud humana como animal (OIE, 2021). Además, puede causar importantes pérdidas económicas en las industrias ganaderas debido a la presentación de abortos y mortinatos en animales de granja como bovinos, suinos, caprinos y ovinos (Boey et al., 2019; Pacheco, 2015).

4.2 Etiología

4.2.1 Clasificación taxonómica de *Leptospira* spp.

La leptospirosis es causada por una bacteria Gram negativa del género *Leptospira* de la familia *Leptospiraceae* del orden Spirochaetales (Torres et al., 2016).

4.2.2 Clasificación serológica

El género *Leptospira*, puede dividirse serológicamente en 20 serogrupos, y estos se agrupan según su composición antigénica en más de 300 serovares (Ospina et al., 2017). Es importante el aislamiento de serovares, para diagnosticar la presencia de la infección en la fase aguda en hospedadores de mantenimiento o accidentales (OIE, 2021).

En la tabla 1 se representa los serogrupos y serovares de las diferentes especies animales como ratas, ratones, bovinos, cerdos, ovinos, equinos, perros y roedores.

Tabla 1
Representación de serogrupos y serovares de algunas especies animales

Serogrupos	Serovares	Hospederos de mantenimiento
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Ratas
Ballum	Ballum	Ratas - ratones
Pomona	Pomona	Bovinos, cerdos, ovinos
Tarassovi	Tarassovi	Cerdos
Australis	Brastislava	Cerdos, Equinos
Sejroe	Sejroe	Bovinos
	Hardjo	Bovinos, ovinos
	Wolffi	Bovinos
Grippotyphosa	Grippotyphosa	Bovinos
Canicola	Canicola	Perros
Bataviae	Bataviae	roedores

Adaptado de: (Bautista et al., 2019; Motto et al., 2021).

4.2.3 Clasificación genotípica

La comparación de las secuencias del gen 16S ARNr permite identificar la filogenia de *Leptospira* (Urbanskas et al., 2022), que se basa en la homología del ADN, que comprende especies genómicas diferentes o genomoespecies (Lopardo et al., 2021). Se clasifican en dos clados, patógenos (P) capaz de infectar animales y humanos; saprofitos (S) encontrados solo en muestras ambientales para los que no hay evidencia de su capacidad de generar infección, y a la vez se subdividen en dos subclados cada uno P1 (patógenas), P2 (intermedias), S1 y S2 (saprofitas) (Grune et al., 2021; Schmidt et al., 2021; Vincent et al., 2019)

Leptospiras patógenas (P1): *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. alexanderi*, *L. weilii*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. mayottensis*, *L. kmetyi*, *L. alstonii*, *L. dzianensis*, *L. barantonil*, *L. kmetyi*, *L. adleri*, *L. putramalaysiae*, *L. typperaryensis*. Leptospiras Intermedia (P2): *L. sarikeiensis*, *L. johnsonii*, *L. licerasiae*, *L. venezuelensis*, *L. dzoumogneensis*, *L. saintgironisae*, *L. selangorensis*, *L. licerasiae*, *L. wolffii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. broomii*. Leptospiras saprofitas (S1): *L. bandrabouensis*, *L. harrisiae*, *L. mtsangambouensis*, *L. meyeri*, *L. perdikensis*, *L. wolbachii*, *L. vanthielii*, *L. brenneri*, *L. congkakensis*, *L. bouyouniensis*, *L. biflexa*, *L. kemamanensis*, *L. jelokensis*, *L. levettii*, *L. ellinghausenii*. Leptospiras saprofitas (S2): *L. illyithenensis*, *L. kobayashii* (Guglielmini et al., 2019; Levett, 2014)

4.3 Características morfológicas, estructurales y microbiológicas de *Leptospira* spp.

En la figura 1 se muestra la morfología típica de *Leptospira* spp., que corresponde a una bacteria helicoidal enrollada estrechamente, delgada, flexible y de 5-60 μm de longitud por 0.1-0.5 μm de diámetro, están constituidas por un cuerpo citoplasmático y un axostilo que se dispone en forma de espiral con una membrana envolvente que recubre ambas estructuras (Chong, 2021).

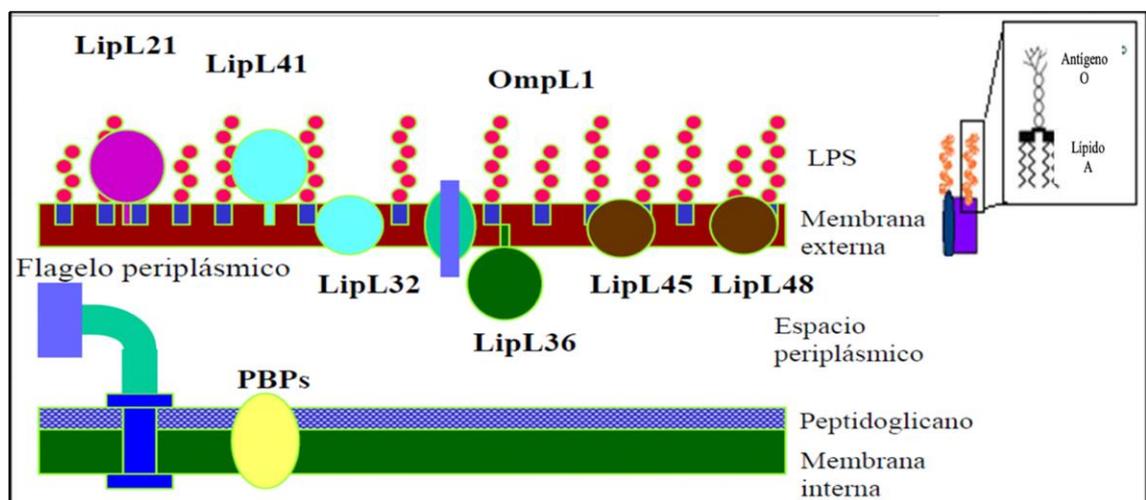
Figura 1
Morfología de Leptospira spp.



Adaptado de: (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010)

En la figura uno se observa la morfología de la bacteria que presenta doble membrana: la membrana citoplasmática y la pared celular de peptidoglicano, ambas asociadas y recubiertas por una membrana externa. Esta membrana externa contiene lipopolisacáridos (LPS) altamente inmunogénicos, responsables de la especificidad de serovares al igual que varias lipoproteínas (LipL32, LipL21, LipL41) y porinas (OmpL1, Omp85)(Chong, 2021); estas bacterias tienen apariencia de gancho en uno o en ambos extremos que generan un movimiento en espiral, gracias a filamentos axiales que se encuentran dentro de su cuerpo en el espacio periplásmico (Chavarría et al., 2015).

Figura 2
Estructura de la membrana celular de Leptospira spp.



Adaptado de: (Becerra et al., 2014).

En la figura dos se representa a las proteínas expuestas en la superficie de la bacteria que pueden promover su interacción con los receptores de las células del hospedador u otras macromoléculas. El LPS posee un lípido A anclado en la membrana bacteriana con una estructura diferente al de las enterobacterias, y representa ser el componente activo responsable de la actividad tóxica del LPS y de sus funciones (Follmer, 2017).

Estas bacterias, son observadas por la técnica de microscopía de campo oscuro; su estructura es de una bacteria Gram negativa que no se tiñe con facilidad, son aerobias obligadas, catalasa y oxidasa positivas y para obtener energía usan sales de amonio y ácidos grasos de cadena larga, estos últimos metabolizados por β - oxidación; por esta razón son de crecimiento lento en los medios de cultivo artificiales enriquecidos, crecen a una temperatura entre 28-30 °C y en un medio con pH que oscila entre 7.2 y 7.6. Son muy sensibles a condiciones adversas como la desecación, cambios bruscos de pH y temperatura (Chavarría et al., 2015).

La viabilidad de la bacteria en el ambiente depende básicamente de las condiciones de pH del suelo, temperatura y humedad del medio. La bacteria es sensible a un pH inferior a 6 superior a 8, también a temperaturas ambientales menores a 7 °C o superiores a 36 °C; el microorganismo no sobrevive en orinas ácidas y se desarrolla en orinas alcalinas (Ávila, 2019).

4.4 Transmisión

Una amplia variedad de mamíferos pueden actuar como reservorios de *Leptospira* patógena en los túbulos renales para luego eliminarla a través de la orina, contaminando así el medio ambiente, provocando infecciones incidentales (Monroy-Díaz et al., 2021). La infección ocurre con mayor frecuencia a través de las membranas mucosas (ojos, la boca, nariz y tracto genital), y también se ha demostrado infección a través de la vía oral en depredadores (Ellis, 2015).

La transmisión vertical de la madre al feto o al neonato, a través de la vía transplacentaria durante el periodo de leptospiremia, y galactófora en donde puede producir mastitis clínica e infectar al ternero por medio de la leche; así como por la transmisión sexual dentro de las especies, por infecciones de cepas adaptadas, donde las vacas son el reservorio de *Leptospira*, se debe considerar que otros animales pueden estar expuestos por contacto directo o indirecto con animales infectados (Ayala, 2017; Boey et al., 2019)

4.5 Patogenia y Respuesta Inmunitaria

La movilidad de los flagelos periplásmicos, permite que las bacterias invadan el organismo de los animales mediante la penetración activa a través de la piel lesionada o la mucosa inactiva (Loureiro & Lilenbaum, 2020a). El período de bacteriemia comienza 1 o 2 días después de la infección; durante este período, las leptospiras pueden aislarse de la sangre y de la mayoría de los órganos del cuerpo y también del líquido cefalorraquídeo. Esta fase finaliza con la aparición de anticuerpos circulantes, que son detectables generalmente después de 10 a 14 días (Ellis, 2015).

Estos microorganismos tienen alta motilidad y producción de enzimas como hemolisinas, fibrinolisin, lipasas, catalasas y hialuronidasa, por lo que tiene tropismo por el hígado y túbulo renales; la inmunología de tipo celular se da por la activación de la fagocitosis de acción mínima debido a la acción citotóxica de la bacteria, resiste la acción del complemento, neutrófilos e induce la apoptosis por los macrófagos (Rojano et al., 2009).

Como las leptospiras son patógenos extracelulares, la respuesta inmune adquirida depende de la producción de anticuerpos. La infección por leptospiras produce una respuesta humoral con producción de inmunoglobulinas (Ig) IgM e IgG que son específicas de serovar. Si bien la producción de IgG es inconstante durante el transcurso de la enfermedad, la respuesta humoral puede ser detectada mediante el test de aglutinación microscópica o MAT a partir de los 5 a 7 días post-infección. El título llega a su máximo en las semanas posteriores y permanece meses a años, aunque puede verse afectado por el tratamiento (Follmer, 2017).

Se presume que el mecanismo de patogenicidad está dado por el sistema inmune, toxinas, adhesinas, lipoproteínas y proteínas superficie, proteínas que son importantes en la patogénesis de la enfermedad que actúan como adhesinas con puntos de fijación de los anticuerpos (Ariza & Berdugo, 2017).

Las leptospiras adaptadas a los bovinos como *Hardjobovis* producen problemas reproductivos e interfieren con la función del cuerpo lúteo, reduciendo los niveles de progesterona, mientras que el serovar *Pomona* que es altamente patógeno puede causar ictericia y abortos en el ganado, lo que produce problemas en la fertilidad (Fogaça et al., 2018).

4.6 Signos clínicos y lesiones

El periodo de incubación es de 7 a 26 días, con un promedio de 12 días. La infección causada por serovares se divide en dos tipos, incidental o adaptadas al huésped. Las infecciones

incidentales o no adaptadas dan como resultado una forma sistémica aguda y grave de la enfermedad, produciendo la excreción renal de la bacteria en forma intermitente; en tanto que las infecciones adaptadas tienen poco efecto clínico y un daño patológico mínimo a sus huéspedes de mantenimiento. Los aspectos clínicos de la leptospirosis bovina indican claramente que es una enfermedad reproductiva independiente de la cepa infecciosa (Goday, 2018; Loureiro & Lilenbaum, 2020a)

En un cuadro agudo, los signos clínicos dependen del grado de resistencia o inmunidad del rebaño, el serotipo infectante y la edad del animal infectado y en forma prácticamente simultánea con la aparición de anticuerpos en sangre, las leptospiras desaparecen del torrente sanguíneo y de la mayoría de los órganos, excepto riñón, cerebro, humor acuoso y tracto genital. Los animales que pasaron la fase aguda inician la fase crónica de la infección, en la cual existen algunas secuelas como abortos y nefritis; es de duración variable, pudiendo ir desde uno o dos meses hasta más de un año (Martínez, 2018).

La leptospirosis bovina se caracteriza principalmente por trastornos reproductivos, como infertilidad, aumentando el número de servicios por concepción e intervalo entre partos prolongado, aborto, ocurrencia de mortinatos y descendencia débil (Ellis, 2015). Los fallos reproductivos silenciosos son la principal manifestación de leptospirosis genital bovina, en su fase crónica (Aymée et al., 2021).

El aborto por leptospirosis se produce principalmente en el último tercio de gestación entre los 6 y 9 meses, la infección puede estar presente varias semanas antes, y el período de incubación en los casos de abortos puede ser largo (Castillo, 2014).

En vacas de primer servicio se puede esperar un bajo índice preñez de hasta un 30 %. El nacimiento de terneros débiles o prematuros se manifiesta cuando la infección se produce al final de la gestación; en situaciones endémicas se puede esperar hasta un 5 % de animales afectados. Los terneros infectados en el útero y que sobreviven a la infección, pueden desarrollar inmunidad y nacer con una infección preestablecida o se hacen inmunotolerantes en el útero, las vacas manifiestan una caída en la producción láctea en un 50 %, pueden presentar agalactia por dos o tres días, además el 15 % de animales pueden presentar mastitis (Martínez, 2018).

La muerte de terneros puede llegar hasta el 5%, pero animales de todas las edades resultan afectados. Se calcula que la morbilidad llega 75 % en los adultos y hasta el 100 % en terneros (Castillo, 2014).

4.7 Diagnóstico

4.7.1 Diagnóstico clínico

El diagnóstico clínico se basa en la epidemiología, anamnesis y signos clínicos del animal, se considera inapropiado llegar a diagnósticos certeros sin el apoyo del laboratorio específico pues únicamente el aislamiento de *Leptospira* patógenas es confirmatorio (Díaz et al., 2020).

Para efecto de realizar un diagnóstico clínico, debe considerarse en la leptospirosis aguda la aparición repentina de agalactia, ictericia y hemoglobinuria, especialmente en los animales jóvenes, tal como ya se indicó anteriormente; la leptospirosis crónica debe considerarse en los siguientes casos: aborto, mortinatos, nacimiento de animales débiles, infertilidad. La localización y la persistencia de leptospiras en el riñón y en el tracto genital de los machos y las hembras son dos secuelas microbiológicas crónicas importantes de la infección por leptospiras que presentan problemas de diagnóstico concretos (OIE, 2021).

La falta de signos en la forma silenciosa de leptospirosis reproductiva en el ganado presenta un verdadero desafío en lo que respecta al diagnóstico. Cuando se detectan signos, no son claros, por lo que con frecuencia se malinterpretan. Dado que la leptospirosis genital bovina (BGL) es una enfermedad poco conocida y que se diagnostica erróneamente, los investigadores la han descuidado en gran medida, por lo tanto, existe una necesidad crítica de desarrollar métodos de diagnóstico (Loureiro & Lilenbaum, 2020a).

4.7.2 Técnicas serológicas para detección de anticuerpos

4.7.2.1. Prueba de aglutinación microscópica (MAT)

Las pruebas serológicas son utilizadas para confirmar el diagnóstico clínico, la prueba de aglutinación microscópica (MAT) es la prueba serológica estándar. Los antígenos seleccionados deben comprender cepas representativas de los serogrupos que se sabe que existen en la región, como los existentes en otros lugares en el huésped en estudio. Un título de 1/100 se considera como positivo, pero dada la alta especificidad del MAT, los títulos más bajos pueden tomarse como evidencia de una exposición previa a *Leptospira* (Strutzberg et al., 2018).

La técnica de MAT se utiliza principalmente para diagnosticar la enfermedad en individuos y en rebaños. Como prueba en un animal individual, es muy útil para diagnosticar una infección aguda cuando se detecta un incremento de cuatro veces en los títulos de anticuerpos en los sueros pareados de animales con infección aguda o convalecientes. Para la obtención de información útil, se deben examinar al menos diez animales o el 10 % del rebaño, el que mayor sea, y documentar el historial de vacunación. La MAT tiene limitaciones en el diagnóstico de la infección crónica en los animales aislados y en el diagnóstico de las infecciones endémicas de los rebaños. Los animales infectados pueden abortar o ser portadores renales y genitales mostrando títulos de MAT por debajo del título mínimo significativo ampliamente aceptado de 1/100 (OIE, 2021).

La técnica MAT es un proceso laborioso ya que varios cultivos de serovares deben mantenerse vivos en un medio líquido. Además, el riesgo de contaminación cruzada entre antígenos hace necesario controlar periódicamente la contaminación del medio de cultivo, lo que puede afectar los resultados de la titulación de la prueba (Oliveira et al., 2021).

4.7.3 Otras pruebas serológicas

La técnica de ELISA se recomienda a nivel predial cuando se tiene que diagnosticar muchos animales o en estudios de prevalencia, es una técnica de baja especificidad y alta sensibilidad, es objetiva, sencilla y rápida, no utiliza antígenos vivos, tiene la capacidad de detectar anticuerpos como IgG como IgM. La desventaja es que la muestra de suero es evaluada para un único grupo o un grupo restringido de serogrupos (Ávila, 2019).

Por otro lado, la inmunofluorescencia es una técnica rápida y sencilla, para la que se necesita un microscopio de fluorescencia y anticuerpos marcados con fluoresceína; estos anticuerpos pueden estar dirigidos contra uno o varios epítomos de una cepa (monovalentes) o de varias cepas (polivalentes). Las muestras positivas son las que presentan elementos espirales reaccionantes (Brihuega et al., 2017).

4.7.4 Detección molecular del agente

La presencia de material genético de leptospiras en los tejidos o en los líquidos corporales se puede poner de manifiesto empleando diversas pruebas basadas en la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), bien sea en tiempo real o en formatos clásicos. Las PCR son sensibles, pero los procedimientos de control de calidad y el procesamiento de las muestras son cruciales y deben adecuarse al tejido, al líquido y a la especie que se esté analizando; con esta técnica no se identifica el serotipo infectante, pero se puede identificar la especie (OIE, 2021).

La detección de genes de *Leptospira* spp. es importante durante la fase inicial de la enfermedad en la que los anticuerpos están por debajo del límite de detección de la mayoría de las pruebas serológicas (Ahmed et al., 2014).

La técnica PCR permite la identificación de portadores; en las muestras de orina, los riñones y los fluidos genitales también se han utilizado con éxito para la detección de ADN de genes comunes a todas las especies de *Leptospira* patógena como el gen *hap 1* o el gen *LipL32*; en el fluido vaginal de animales representa un hallazgo importante a la posibilidad de transmisión sexual en esta especie y contribuye significativamente en el desarrollo de estrategias de prevención y control en hatos con trastornos reproductivos (Pinna et al., 2018; Santana et al., 2016).

Esta técnica permite detectar el material genético incluso cuando las bacterias no son viables, su éxito depende del paso previo de extracción y purificación del material genético a fin de eliminar de la muestra posibles contaminantes e inhibidores de la reacción, manteniendo la calidad e integridad de la secuencia diana a amplificar, además permite trabajar con ADN parcialmente degradado o desnaturalizado (Hamer et al., 2019).

En la tabla dos se muestran diferentes tipos de PCR que se han empleado para detección de *Leptospira*

Tabla 2

Tipos de PCR utilizados para diagnóstico de leptospirosis en algunas investigaciones.

Tipos de PCR	Gen de interés	Referencias
PCR convencional	Gen <i>ARNr</i> permite la clasificación filogénica, primer marcador molecular.	(Urbanskas et al., 2022)
qRT - PCR PCR en tiempo real son más rápidas, muy sensibles y requieren menos manipulación del producto que la PCR convencional.	Gen <i>seg Y</i>	(Padilha et al., 2022)
qRT - PCR – HRM	Gen <i>lfb1; secY</i>	(Padilha et al., 2022)
qTR – PCR Permite diagnosticar de forma sencilla y rápida el patógeno con una alta especificidad	Gen <i>lipL32</i> : codifica una proteína externa que está presente en las <i>Leptospira</i> patógena, pero ausente en las no patógenas.	(Chang et al., 2016; Suwancharoen et al., 2016)
LAMP Prueba isotérmica, se realiza a una temperatura constante.	La sensibilidad y especificidad es superior a la prueba de PCR.	(Garrido, 2016)

4.7.5 Aislamiento del agente

El aislamiento es la técnica más sensible para el diagnóstico de la leptospirosis aguda y crónica (Masmela & Gutiérrez, 2021a), por lo tanto, se utiliza un medio selectivo, que tiene mayor sensibilidad y menos contaminación (Barrandeguy, 2021). El cultivo debe realizarse en un medio líquido o semisólido (agar al 0,1–0,2%) con seroalbúmina bovina (BSA) o bien con Tween 80 (medio EMJH2) o una combinación de Tween 80 y Tween 40. Los cultivos deben incubarse a una temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 a 26 semanas, dependiendo de su serotipo para su detección (OIE, 2021).

4.8 Control y prevención de la enfermedad

Para el control es necesario disminuir el impacto de la enfermedad en el ganado bovino, implementando tratamiento con antibióticos, la vacunación y profilaxis sanitaria, limitando la propagación o distribución del agente patógeno (Masmela & Gutiérrez, 2021a), sin embargo, el control es difícil cuando se trata de una enfermedad crónica causada por cepas adaptadas. Como

se trata de una enfermedad reproductiva, sería más apropiado un sistema de manejo reproductivo adecuado para evitar la transmisión sexual (Loureiro & Lilenbaum, 2020b).

La prevención se basa en estrategias de inmunización de los animales utilizando vacunas efectivas para gran variedad de serotipos de *Leptospira*; la revacunación en corto tiempo garantiza la inmunización (Suárez et al., 2017), sin embargo, la vacuna no previene la excreción renal del patógeno, lo que permite la contaminación ambiental y una mayor propagación entre los rebaños y otros animales salvajes o domésticos (Polo et al., 2019).

La leptospirosis en bovinos es endémica en el Ecuador y existe poca información sobre los serovares, por lo que los productos biológicos utilizados para inmunizar el ganado pueden brindar una protección parcial contra la enfermedad. (Luna et al., 2019). Es un problema creciente en salud pública, su tratamiento es casi siempre empírico por la falta de métodos de diagnóstico rápidos y precisos, evitando la resistencia a los antibióticos (Hernández et al., 2021).

Dentro de un plan de control eficiente debe considerarse además la exposición a los factores de riesgo, que pueden estar sujetos a las condiciones ambientales, las prácticas de manejo, perfil reproductivo, que en cada unidad de producción se debe identificar (Vanegas, 2018).

4.9 Tratamiento

El tratamiento debe ser oportuno, suele fracasar por la gravedad de la enfermedad debido a las lesiones renales que presenta el animal o la presencia de infección intrauterina. La terapéutica sintomática y la administración de antibióticos permitirá mantener al animal en el mejor estado posible y eliminar al agente infeccioso (Díaz et al., 2020).

Los antibióticos se utilizan a menudo al comienzo del programa para reducir el número de animales infectados y minimizar la eliminación de la bacteria en la orina y la transmisión entre bovinos con resultados satisfactorios. Sin embargo, cuando el fármaco se administra directamente en el útero, se consiguen fácilmente concentraciones elevadas en el sitio de la infección (Loureiro & Lilenbaum, 2020a; Masmela & Gutiérrez, 2021).

Estas bacterias son altamente sensibles a eritromicina, tiamulina y tilosina, pero estos antibióticos no eliminan el estado de portador renal por lo que se recomienda el uso de dihidroestreptomicina, amoxicilina, la oxitetraciclina y el ceftiofur (González & Rivera, 2015).

En la tabla 3 se muestran los productos antibióticos empleados comúnmente para el tratamiento de leptospirosis bovina.

Tabla 3*Antibióticos para el tratamiento de leptospirosis bovina*

Antibiótico	Dosis
Dihidroestreptomicina	25 mg / kg dosis unica IM. 12,5 mg / kg dos veces al día por tres días consecutivos.
Penicilina G	25 mg / kg una dosis
Oxitetraciclina	10 - 20 mg / kg IM
Tilmicosina	10 mg / kg SC
Ceftiofur	2.2 o 5 mg / kg IM, una vez al día durante 5 días, o 20 mg / kg IM, una vez al día durante 3 días

Adaptado de (Loureiro & Lilenbaum, 2020a; Masmela & Gutiérrez, 2021).

4.10 Epidemiología

La leptospirosis puede afectar una gran variedad de especies animales que pueden servir como reservorios y fuentes de infección para humanos y otros animales domésticos y salvajes (Góngora et al., 2022).

Estudios realizados en muestras humanas de sangre y orina para detección de *Leptospira* en zonas rurales de la provincia de Manabí en pacientes con fiebre el 14,7% dieron positivo; en muestras de orina tomadas en mataderos, el 35,8 % de bovinos y 21,1 % de porcinos dieron positivos, lo que estos animales pueden ser los principales transmisores de esta zoonosis (Barragan et al., 2016). Otros estudios realizados de seroprevalencia en bovinos como en la provincia de Manabí el 57,38 % (Burgos et al., 2019); en el cantón el Pangui el 12,21 % (Muyulema, 2020); en el cantón Loja 30,08 % (Luna et al., 2019).

Datos epidemiológicos del Ministerio de Salud Pública, entre los años 2016 a 2018 mencionan de 363 casos confirmados, durante el año 2020 se notifican 131 casos, en el 2021 se notifican 75 casos, en el 2022 mencionan 126 casos notificados, hasta el 12 de marzo de 2023 se registran 54 casos, lo que indica la importancia de estudiar a enfermedad zoonótica (MSP, 2022).

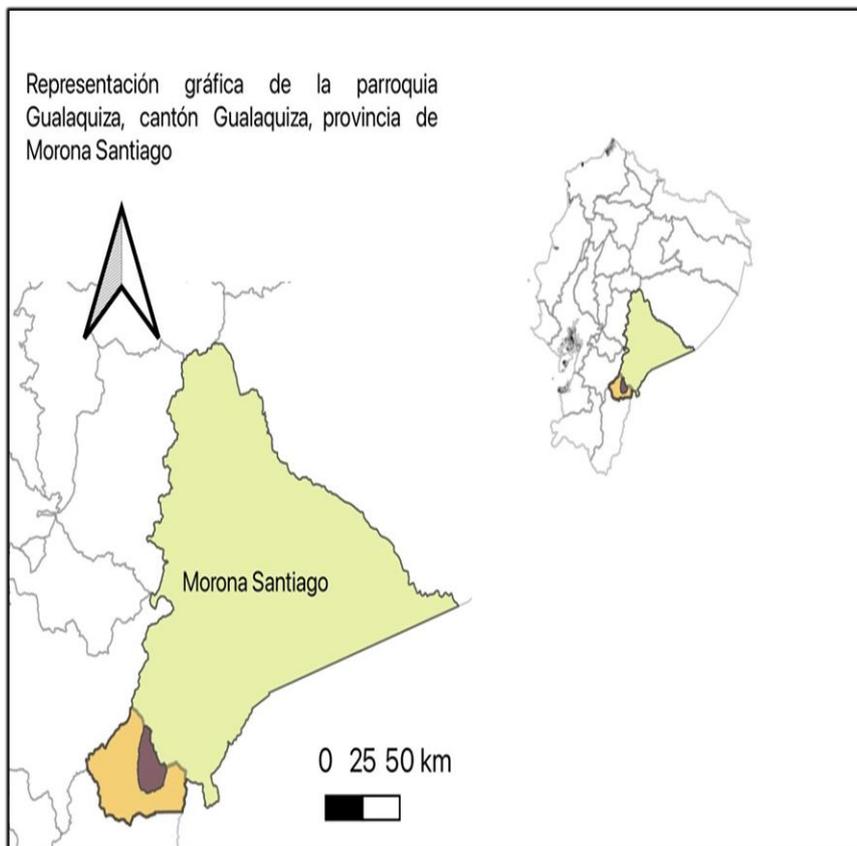
5. Metodología

5.1 Lugar de ejecución y período

El presente estudio se desarrolló en el camal municipal del cantón Gualaquiza ubicado al suroeste de la provincia de Morona Santiago, durante los meses de junio y julio de 2022, en el que se faenan al mes un promedio de 100 bovinos de diferentes edades y razas; la procedencia de los bovinos es de las parroquias del cantón Gualaquiza. El cantón cuenta un clima húmedo subtropical y lluviosa temperado, el promedio de temperatura es de 12°C a 24°C, localizada desde altitudes de 600 m.s.n.m hasta 3000 m.s.n.m (GAD Municipal de Gualaquiza, 2018).

Figura 3

Representación gráfica de la parroquia Gualaquiza, cantón Gualaquiza, provincia de Morona Santiago.



5.2 Diseño de la investigación

El presente es un estudio observacional de tipo transversal, que se ejecutó en dos fases; una fase de campo en la que se recogió muestras de sangre, orina y lavado uterino e información perteneciente a los animales; y, una fase de laboratorio, en la que se detectó anticuerpos contra *Leptospira* spp. mediante aglutinación microscópica (MAT) y el agente patógeno mediante diagnóstico por PCR convencional (gen *hap1*).

5.3 Tamaño de la muestra y tipo de muestreo

Se realizó un muestreo no probabilístico durante los meses de junio y julio de 2022, habiéndose seleccionado, 50 animales con las siguientes características: hembras bovinas de edad reproductiva (sobre los 14 meses de edad).

5.4 Registro de información de campo

La información recabada que se registró en cuanto a la edad, raza y estado reproductivo fue organizada en registros de campo, en los cuales se asignaron códigos para cada animal con fines de organización, por lo que las muestras obtenidas fueron rotuladas de acuerdo a dicha codificación.

5.5 Toma, transporte y conservación de muestras biológicas

Las muestras de sangre fueron extraídas por venopunción de la vena yugular en cantidad de 10 ml, utilizando tubos vacutainer sin anticoagulante. Las muestras de orina fueron obtenidas durante el proceso de evisceración mediante cistocentesis en cantidad de 3ml en tubos eppendorf. Para la colecta de la muestra del tracto reproductor, luego del proceso de evisceración se introdujo en el útero una sonda Foley, a través de la cual se administró suero fisiológico al 0.9% en cantidad aproximada de 15 ml, para posteriormente realizar un masaje del órgano y extraer 10 ml de lavado uterino, colocando en tubos Falcon estériles.

Para la obtención de suero sanguíneo se utilizó una centrifuga de campo a 1500 g durante 10 minutos. Todas las muestras fueron debidamente identificadas y transportadas en condiciones adecuadas a los laboratorios del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

5.6 Detección de anticuerpos y determinación de serovares mediante aglutinación microscópica (MAT).

La detección de anticuerpos contra *Leptospira* patógena se realizó por medio de la técnica de MAT. Se empleó un panel de siete serovares de antígenos vivos de *Leptospira*

borgpetersenii serovar Sejroe, *Leptospira interrogans* serovares Canicola, Tarassovi, Bataviae, Pomona, Wolffii y Hardjo.

Para la interpretación un título de 1/100 fue considerado como positivo. Con respecto al proceso de titulación se siguió el procedimiento recomendado por el Manual de Código Terrestre, en donde se sugiere realizar diluciones dobles del suero, las mismas que se realizaron hasta 1/1600. Se consideró además que en caso de detectarse coaglutinaciones la muestra se considera positiva con el serovar con la titulación más alta (OIE, 2021).

5.7 Detección de *Leptospira* spp. mediante PCR convencional

El diagnóstico molecular mediante PCR para detectar la presencia de *Leptospira* patógena en muestras de orina y lavado uterino, se realizó considerando lo siguiente: 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.

5.8 Definición de caso

Se consideró un caso positivo a leptospirosis a cualquier animal con resultado PCR positivo a partir del procesamiento de las muestras de orina o útero, acompañado o no de un resultado positivo en MAT con un punto de corte $\geq 1:100$.

5.9 El análisis estadístico

Los resultados obtenidos del diagnóstico se analizaron mediante estadística descriptiva empleando tablas de frecuencia para expresar datos en porcentaje respecto a la edad y la raza de los animales. Para establecer la relación entre la colonización renal o uterina con el serovar infectante se consideró realizar el test Chi cuadrado y/o Test de Fisher tomando en cuenta un

valor de p menor a 0,05 como estadísticamente significativo. Dicho análisis se realizó en el software estadístico RStudio versión 1.1.463.

6. Resultados

6.1 Características de los animales estudiados

Los animales considerados para el estudio fueron 50 hembras bovinas de edad reproductiva entre los 14 y 60 meses, mestizas (10 %), de razas Charoláis (35 %), Brown Swiss (8 %) y Holstein Friesian (2 %).

6.2 Resultados del diagnóstico serológico de leptospirosis en hembras bovinas faenadas en el cantón Gualaquiza

No hubo ningún animal seropositivo en MAT considerando un punto de corte de 1/100; sin embargo, una muestra de suero de un animal mostró aglutinación en una titulación de 1/50 frente al serovar Bataviae.

6.3 Resultados del diagnóstico mediante PCR convencional

Dos de las 50 muestras de orina resultaron positivas mediante PCR convencional, confirmando la eliminación de *Leptospira* por esta vía; mientras que dos animales fueron positivos en PCR a partir de muestras uterinas. Las muestras de orina con resultado positivo a PCR corresponden a un animal mestizo de 48 meses de edad y una hembra Charoláis de 16 meses de edad, mientras que en las muestras uterinas pertenecen a una hembra Brown Swiss de 36 meses de edad y una Charoláis de 24 meses de edad (Tabla 4).

Tabla 4*Leptospira* en estado de infección por medio de detección molecular PCR.

Categoría	Detección de <i>Leptospira</i> en orina					Detección de <i>Leptospira</i> en útero			
	Total	Positivo		Negativo		Positivo		Negativo	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Edad									
Grupo etario 1 (14-24)	28	1	2	27	54	1	2	27	54
Grupo etario 2 (25-48)	16	1	2	15	30	1	2	15	30
Grupo etario 3 (49-60)	6	0	0	6	12	0	0	6	12
Raza									
Mestizo	10	1	2	9	18	0	0	10	20
Charolais	35	1	2	34	68	1	2	34	68
Brown swiss	4	0	0	4	8	1	2	3	6
Holstein friesian	1	0	0	1	2	0	0	1	2
Total	50	2	4	48	96	2	4	48	96

En función de los resultados encontrados en serología no se pudo determinar la relación entre los serovares infectantes y el tipo de colonización.

7. Discusión

7.1 Diagnóstico serológico

Los resultados negativos encontrados en el presente estudio mediante la prueba de MAT podrían indicar la ausencia de la enfermedad en su fase aguda; sin embargo, es importante señalar que la sensibilidad de la prueba depende del panel de serovares utilizado por lo que no puede descartarse la posibilidad de la existencia de animales seropositivos con el uso de un panel diagnóstico más amplio. Además, MAT tiene limitaciones para la identificación de animales enfermos crónicos, que pueden abortar o ser portadores renales y genitales con títulos por debajo de 1/100 (OIE, 2021).

El resultado de la aglutinación de 1/50 para el serovar *Bataviae* en una de las muestras analizadas en este estudio, probablemente se atribuye a una infección crónica en donde la presencia de títulos bajos de anticuerpos indica la exposición del animal frente al agente patógeno. *Bataviae* ha sido un serovar reportado en especies silvestres de roedores (Benacer et al., 2016), lo que podría sugerir una interacción entre estos hospedadores de mantenimiento y los animales domésticos como el ganado bovino.

En otros estudios realizados en el Ecuador se han reportado diversos serovares, así por ejemplo en el cantón El Pangui (a 25 km del cantón Gualaquiza) se encontraron animales positivos para el serovar *Australis*, por lo que habría que considerarlo para futuras investigaciones; es necesario mencionar que en este mismo estudio se registró una prevalencia de infección del 12,21% utilizando un panel de ocho serovares (Muyulema, 2020); mientras tanto, en Manabí la seroprevalencia encontrada fue del 57,38 % en el 2019 utilizando un panel de ocho serovares, en donde el serovar *Pomona* fue el más frecuente (Burgos et al., 2019); asimismo, en Loja la prevalencia reportada para el 2019 fue del 30,08% en un panel de dieciocho serovares, siendo los serovares más frecuentes *Canicola* y *Bataviae* (Luna et al., 2019).

Estudios con la técnica de MAT en Colombia en el Departamento de Antioquia, demostraron una prevalencia del 69,9 %, en vacas con problemas reproductivos (Suárez et al., 2017b); mientras que, en México, en un estudio de hembras bovinas en edad reproductiva, la unidad de producción presentó una frecuencia de 24,1 % (Ramos, et al., 2019). Es probable que en estas investigaciones las seroprevalencias sean más elevadas por cuanto los animales seleccionados tenían antecedentes de problemas reproductivos.

7.2 Detección de *Leptospira* patógena

La *Leptospira* spp. pueden encontrarse circulantes en la sangre, orina, tejidos y en los órganos reproductivos de los animales infectados. Transcurrida la fase de leptospiremia, pueden eliminarse de forma intermitente durante la micción, pero al no ser detectada en la orina no se descarta que el animal sea un portador renal crónico (Urioste, 2021). En este estudio al analizar muestras de serológicas por MAT se obtuvo resultados negativos; por medio de detección molecular en muestras de orina y útero se obtuvo 4 resultados positivos.

En estudios similares en bovinos hembras en edad reproductiva, en Brasil se detectó ADN de *Leptospira* spp. en el 66,7 % de animales (Aymée et al., 2021), demostrando una cifra importante en bovinos con baja eficiencia reproductiva por la colonización genital de la bacteria; así mismo, en un estudio realizado en un camal de Río de Janeiro en vacas no gestantes, el 26,2 % fueron positivas, las muestras analizadas fueron de sangre y fragmentos uterinos (di Azevedo et al., 2020). La colonización de la bacteria en el tracto reproductivo genera pérdidas en la producción y reproducción de las ganaderías.

La detección del patógeno en la orina ha sido el procedimiento de elección para demostrar el estado de portador renal de los animales infectados, así, por ejemplo, a partir de muestras de orina de bovinos tomadas en un camal municipal del estado de Paraná, Brasil, se estimó una frecuencia de 14,9% (Guedes et al., 2019). La presencia de la bacteria en el útero puede interferir en la concepción y el desarrollo embrionario, a la vez, la detección renal de la bacteria demuestra el tropismo que tiene por dicho órgano (Urioste, 2021).

En este estudio, se detectó *Leptospira* patógena en el 4 % (2/50) de las muestras de orina y en el 4 % (2/50) de las muestras uterinas, totalizando 4 hembras bovinas con diagnóstico positivo a PCR (*hap1*). Sin embargo, otros realizados en Ecuador la frecuencia de detección ha sido mayor, así por ejemplo en Manabí, en 72 muestras de orina se obtuvo 10 muestras positivas en PCR para detección del *gen rrl* (Revelo et al., 2020); en Loja, en 90 muestras de orina analizadas por la técnica qPCR se obtuvo 19 positivas, de las cuales se analizan por PCR convencional obteniendo la amplificación de 11 positivas, en las que sometidas a procesos de secuenciación se identifican en tres muestras especies de leptospirosis patógena, con el fin de construir un árbol filogénico detectando el *gen rrs* (Román, 2016).

La sensibilidad de diagnóstico de la técnica molecular PCR, permite utilizarle como complemento de la prueba serológica MAT, durante los primeros días de enfermedad o cuando

se carece de muestras pareadas, permitiendo un diagnóstico preciso (Sandoval et al., 2018). En esta investigación los animales PCR positivos, no fueron seropositivos, y solo uno fue positivo con titulación baja (1/50 para *Bataviae*).

La presencia de *Leptospira* en el útero de las vacas interfiere con la implantación del embrión u otros eventos tempranos de la preñez, los mecanismos de defensa son afectados por los cambios de pH intrauterino y por la actividad hormonal, permitiendo una invasión de agentes infecciosos generando una respuesta inflamatoria (Mosquera et al., 2022); en el estado de portador renal permite la persistencia y su multiplicación, siendo eliminado por la orina por largos periodos de tiempo, generando en el animal portador diferentes cuadros clínicos (García et al., 2014).

La detección de leptospiras en orina y útero por técnicas moleculares de PCR, permite establecer que existe la presencia de la infección en la zona, la transmisión de la bacteria puede ser atribuida a diversos factores como causas ambientales o entre animales, generando pérdidas en la producción y reproducción en las ganaderías de bovinos.

8. Conclusiones

No se detectaron animales con anticuerpos contra *Leptospira* patógena en MAT en un punto de corte de 1/100; sin embargo, en un animal se detectó aglutinación en una dilución de 1/50 (*Bataviae*), que por su resultado PCR positivo, se sugiere que es un animal que ha estado expuesto a *Leptospira* spp. y que mantiene colonización renal del patógeno

En el análisis de las muestras de útero y orina por PCR convencional, se obtuvo una frecuencia de animales positivos del 8 %, lo que indica la presencia de la infección en las diferentes ganaderías del cantón Gualaquiza, siendo un riesgo sanitario para las personas que laboran en el cuidado de los animales y personal que trabajan en el camal.

No se pudo determinar la relación de serovares infectantes y el tipo de colonización uterina y renal, en las hembras bovinas en edad reproductiva.

9. Recomendaciones

Motivar a los ganaderos la implementación del control sanitario de *Leptospira* spp , con una cultura de prevención, evitando que los animales se contagien y sea un riesgo para las personas que lo manipulan.

Los resultados obtenidos en esta investigación, determinan la importancia de realizar capacitaciones a los ganaderos, profesionales relacionados con la cadena productiva y personal que labora en la manipulación de los bovinos acerca de los riesgos a lo que están expuestos, para que mejoren las medidas de bioseguridad en el camal Municipal.

Realizar estudios complementarios a esta investigación aumentando el tamaño muestral y un panel de serovares más amplio que permita un mejor conocimiento del estado epidemiológico de la enfermedad.

10. Bibliografía

- Adler, B., & de la Peña Moctezuma, A. (2010). Leptospira and leptospirosis. In *Veterinary Microbiology* (Vol. 140, Issues 3–4, pp. 287–296). <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
- Ahmed, A., van der Linden, H., & Hartskeerl, R. A. (2014). Development of a recombinase polymerase amplification assay for the detection of pathogenic *Leptospira*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *11*(5), 4953–4964. <https://doi.org/10.3390/ijerph110504953>
- Ariza, Á., & Berdugo, C. (2017). Actualización de la Leptospirosis bovina en Colombia. *Conexión Agropecuaria*, *7*(1), 57–77.
- Ávila, S. (2019). Evaluación de un kit de elisa indirecto para el diagnóstico de leptospirosis bovina. *Biblioteca Digital Veterinaria Departamento de Documentación y Biblioteca*.
- Ayala, L. (2017). *Determinar la presencia de Leptospira spp. y lesiones renales en roedores de cañaverales de la región nor-occidental de Nicaragua*. <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/7531/1/242684.pdf>
- Aymée, L., Gregg, W. R. R., Loureiro, A. P., di Azevedo, M. I. N., Pedrosa, J. de S., Melo, J. dos S. L. de, Carvalho-Costa, F. A., de Souza, G. N., & Lilenbaum, W. (2021). Bovine Genital Leptospirosis and reproductive disorders of live subfertile cows under field conditions. *Veterinary Microbiology*, *261*. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109213>
- Barragan, V., Chiriboga, J., Miller, E., Olivas, S., Birdsell, D., Hepp, C., Hornstra, H., Schupp, J. M., Morales, M., Gonzalez, M., Reyes, S., de la Cruz, C., Keim, P., Hartskeerl, R., Trueba, G., & Pearson, T. (2016). High *Leptospira* Diversity in Animals and Humans Complicates the Search for Common Reservoirs of Human Disease in Rural Ecuador. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004990>
- Barrandeguy, N. (2021). *Evaluación de diferentes métodos de laboratorio para el diagnóstico de leptospirosis bovina*.
- Bautista, B., Bulla, D., López, A., Díaz, A., & Pulido, Martín. (2019). Leptospirosis: enfermedad de importancia en salud pública. *Revista Colombiana de Ciencia Animal RECIA ISSN: 2027-4297*. <https://doi.org/10.24188/recia.v11.n1.2019.727>

- Becerra, R., Rocio, L., & Carlos, V. L. (2014). *Leptospirosis bovina como causa de enfermedad reproductiva*.
- Benacer, D., Mohd Zain, S. N., Sim, S. Z., Mohd Khalid, M. K. N., Galloway, R. L., Souris, M., & Thong, K. L. (2016). Determination of *Leptospira borgpetersenii* serovar Javanica and *Leptospira interrogans* serovar Bataviae as the persistent *Leptospira* serovars circulating in the urban rat populations in Peninsular Malaysia. *Parasites and Vectors*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1400-1>
- Boey, K., Shiokawa, K., & Rajeev, S. (2019). *Leptospira* infection in rats: A literature review of global prevalence and distribution. In *PLoS Neglected Tropical Diseases* (Vol. 13, Issue 8). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007499>
- Burgos, D., Pérez, M., Bulnes, C. A., Zambrano, M. D., Sandoval, H. P., Falconi, M. A., Vera, L., Revelo, A. P., & 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. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 38(3). <https://doi.org/10.20506/rst.38.3.3026>
- Castillo, M. (2014). *LEPTOSPIRA EN GANADO BOVINO* [Tesis]. Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro.
- Chang, M. Y., Cheng, Y. C., Hsu, S. H., Ma, T. L., Chou, L. F., Hsu, H. H., Tian, Y. C., Chen, Y. C., Sun, Y. J., Hung, C. C., Pan, R. L., & Yang, C. W. (2016). Leptospiral outer membrane protein LipL32 induces inflammation and kidney injury in zebrafish larvae. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep27838>
- Chavarría, J., Lara, D., Méndez, W., & Moscoso, J. (2015). *Leptospira: revisión del agente causal de una enfermedad zoonótica*.
- Chong, L. (2021). *Identificación de especies patógenas de leptospira y borrelia en garrapatas de bovinos y équidos de unidades de producción bovina del centro de Veracruz*.
- da Silva, C., Riet, F., & Giannitti, F. (2019). *Enfermedades infecciosas que causan abortos en bovinos con enfoque en rodeos lecheros de Uruguay* [Universidad de la República - Uruguay]. <https://doi.org/https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/bitstream/handle/123456789/2693/silvaS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- di Azevedo, M. I. N., Pires, B. C., Libonati, H., Pinto, P. S., Cardoso Barbosa, L. F., Carvalho-Costa, F. A., & Lilenbaum, W. (2020). Extra-renal bovine leptospirosis: Molecular characterization of the *Leptospira interrogans* Sejroe serogroup on the uterus of non-pregnant cows. *Veterinary Microbiology*, 250. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108869>
- Díaz, Á. L. M., Arias, J. A. V., Iriarte, G. D. F., & Ramírez, J. J. Q. (2020). Leptospirosis en reservorios animales: Una revisión de tema. *Revista Lasallista de Investigacion*, 17(2), 267–279. <https://doi.org/10.22507/rli.v17n2a23>
- Ellis, W. (2015). *Current Topics in Microbiology and Immunology*. <http://www.springer.com/series/82>
- Fogaça, D., Dutra, H., & Oliveira, C. (2018). Leptospirose em propriedade rural com histórico de aborto em vacas leiteiras no Município de Trindade, Estado de Goiás - relato de caso. *Enciclopédia Biosfera*, 15(27), 108–120. https://doi.org/10.18677/encibio_2018a57
- Follmer, A. (2017). *Estudio retrospectivo de leptospirosis en fetos bovinos en la provincia de La Pampa*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA.
- GAD Municipal de Gualaquiza. (2018). *Cantón Gualaquiza*. GAD MUNICIPAL DE GUALAQUIZA.
- García, J., Tena, M., & Val, D. (2014). *Determinación de la presencia de leptospira Borgpetersenii serovar Hardjo tipo bovis, en ganado lechero en México*. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.
- Garrido, P. (2016). Técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle o LAMP. Ventajas en el Diagnóstico Sanitario. *Ecuador Es Calidad*, 3, 11–12. <https://revistaecuadorestcalidad.agrocalidad.gob.ec/revistaecuadorestcalidad/index.php/revista/article/view/50/126>
- Godoy, F. (2018). *Caracterización de la población de equinos con sospecha de leptospirosis remitidos al laboratorio Dilave-DGSG-MGAP en los últimos cinco años*. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/25150/1/FV-33423.pdf>
- Góngora, A., Parra, J. L., & Sarmiento, L. (2022). Bovine leptospirosis: effects on reproduction and an approach to research in Colombia. In *Tropical Animal Health and Production* (Vol.

54, Issue 5). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11250-022-03235-2>

González, F., & Rivera, S. (2015). Caracterización de la leptospirosis bovina en Venezuela. *Revista Electrónica Veterinaria*, *16*(2), 8.

Grune, S., Periago, M. v, Watanabe, O., Saraullo, V., Aldama, E., Cejas, R. G., Cruz, D., Delgado, C., Goizueta, C. M., Hamer, M., Martínez, M., & Brihuega, B. F. (2021). Detección de *Leptospira* spp. (Spirochaetales: Leptospiraceae) en muestras ambientales de regiones habitadas por poblaciones vulnerables del norte Argentino. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, *20*(2), 91–96. <https://doi.org/10.14409/favecv.v20i2.10119>

Guedes, I. B., Araújo, S. A. de A., de Souza, G. O., de Souza Silva, S. O., Taniwaki, S. A., Cortez, A., Brandão, P. E., & Heinemann, M. B. (2019). Circulating *Leptospira* species identified in cattle of the Brazilian Amazon. *Acta Tropica*, *191*. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.01.011>

Guglielmini, J., Bourhy, P., Schiettekatte, O., Zinini, F., Brisse, S., & Picardeau, M. (2019). Genus-wide *Leptospira* core genome multilocus sequence typing for strain taxonomy and global surveillance. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007374>

Hamer, M., Saraullo, V., Brihuega, B., Watanave, O., Martinez, M., & Grune Loffler, S. (2019a). Comparación de métodos de extracción de ADN simples y económicos para el diagnóstico molecular de leptospirosis animal. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, *18*(2), 68–73. <https://doi.org/10.14409/favecv.v18i2.8752>

Hamer, M., Saraullo, V., Brihuega, B., Watanave, O., Martinez, M., & Grune Loffler, S. (2019b). Comparación de métodos de extracción de ADN simples y económicos para el diagnóstico molecular de leptospirosis animal. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, *18*(2), 68–73. <https://doi.org/10.14409/favecv.v18i2.8752>

Hernández, P., Pabón, L., & Rodríguez, M. (2021). Leptospirosis, una zoonosis que impacta a la salud: diagnóstico, tratamiento y nuevas alternativas de control. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 1–24. <http://orcid.org/0000-0003-1730-9648>

Koval, A. A., Brihuega, B. F., Grune Loffler, S., López, S., saint Martin, M., Lagioia, G. G., & Insaugarat, J. R. (2020). First isolation of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo type

- Hardjo Bovis from a clinical case in cattle in Argentina. *Revista Argentina de Microbiologia*, 52(3), 198–201. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.10.002>
- Levett, P. (2014). *Systematics of Leptospiraceae* (Vol. 387). Ben Adler. <http://www.springer.com/series/82>
- Lopardo, H. A., Garrahan, J. P., & Predari, S. C. (2021). *Bacterias de Importancia Clínica*. <https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/Leptospira.pdf>
- Loureiro, A. P., & Lilenbaum, W. (2020a). Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. In *Theriogenology* (Vol. 141, pp. 41–47). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.011>
- Loureiro, A. P., & Lilenbaum, W. (2020b). Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. In *Theriogenology* (Vol. 141, pp. 41–47). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.011>
- Luna, J., Chávez, R., & Román, F. (2019). Factores de riesgo asociados a la leptospirosis bovina en el sur del Ecuador. *Revista de La Dirección de Investigación. CEDAMAZ*, 09(02).
- Martínez, M. (2018). *Desarrollo y validación de un inmunoensayo para diagnóstico de Leptospiriosis bovina en la región Pampeana Argentina* [Tesis bioquímica]. Universidad de Buenos Aires.
- Masmela, A., & Gutiérrez, C. (2021a). *Leptospiriosis bovina enfocado en el potencial zoonótico, alternativas de control y tratamiento*. <https://repository.ucc.edu.co/handle/20.500.12494/45408>
- Masmela, A., & Gutiérrez, C. (2021b). *Leptospiriosis bovina enfocado en el potencial zoonótico, alternativas de control y tratamiento*.
- Monroy-Díaz, Á. L., Vargas-Arias, J. A., Di Filippo-Iriarte, G., & Quimbaya-Ramírez, J. J. (2021). Leptospiriosis en reservorios animales. *Revista Lasallista de Investigación*, 17(2), 266–279. <https://doi.org/10.22507/rli.v17n2a23>
- Mosquera, M., Armas, E., Alvarez, K., García, M., López, M., & Díaz, R. (2022, June 28). Alteraciones genitales en la infección por leptospirosis en ratas Wistar gestantes. *Ciencias Médicas*, 1–9.

- Motto, S. K., Shirima, G. M., de Clare Bronsvort, B. M., & Cook, E. A. J. (2021). Epidemiology of leptospirosis in tanzania: A review of the current status, serogroup diversity and reservoirs. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009918>
- MSP. (2022). GACETA-ZOONOTICA-SE-51. *Subsecretaria Nacional de Vigilancia, Prevención y Control de La Salud Pública*, 2–3. <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2023/01/GACETA-ZOONOTICA-SE-51.pdf>
- Muyulema, E. (2020). *Estudio clínico epidemiológico de leptospirosis en hembras bovinas en edad reproductiva en el cantón el Pangui*. ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.
- OIE. (2021). Capítulo: 3.1.12 Leptospirosis. *Manual Terrestre de La OIE*.
- Oliveira, H., Souza, M., Fernandes, T., Mafra, P., & Correia, A. (2021). Development and standardization of the Dot Blot test for serological diagnosis of bovine leptospirosis. *Research, Society and Development*, 10(6). <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i6.15091>
- Ordóñez, G., Avilés, D., Borja, B., & Condolo, L. (2021). Relación entre enfermedades infecciosas y parámetros reproductivos con énfasis en el perfil reproductivo. In *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal AICA* (Vol. 16).
- Ospina, C., Rincón, M., Soler, D., & Hernández, P. (2017). The role of rodents in the transmission of *Leptospira* spp. in swine farms. *Revista de Salud Pública*, 19(4), 555–561. <https://doi.org/10.15446/rsap.v19n4.41626>
- Pacheco, G. (2015). *Una visión general de la leptospirosis Artículo de Revisión* (Vol. 4, Issue 1).
- Padilha, B. C. R., Silveira, M. M., & Hartwig, D. D. (2022). Molecular and serological diagnostic of leptospirosis: a review (2014–2020). *Research, Society and Development*, 11(2), e19511225471. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25471>
- Pinna, M. H., Martins, G., Loureiro, A. P., & Lilenbaum, W. (2018). Detection of bovine carriers of *Leptospira* by serological, bacteriological, and molecular tools. *Tropical Animal Health and Production*, 50(4), 883–888. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1512-z>

- Polo, N., Machado, G., Rodrigues, R., Hamrick, P. N., Munoz-Zanzi, C., Pereira, M. M., Bercini, M., Timm, L. N., & Schneider, M. C. (2019). A one health approach to investigating *Leptospira* serogroups and their spatial distributions among humans and animals in Rio Grande do Sul, Brazil, 2013-2015. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4(1). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010042>
- Ramos, J., Cruz, A., Barrientos, C., & Alfonso, A. (2019). *Análisis genómico de aislamientos de Leptospira spp. en bovinos de una unidad de producción del municipio de Cuitláhuac, Veracruz*. [Maestro en Ciencia Animal]. Universidad Veracruzana.
- Ramos, J., Romero, A., Barrientos, C., & Aguilera, A. (2019). *Análisis genómico de aislamientos de Leptospira spp. en bovinos de una unidad de producción del municipio de Cuitláhuac, Veracruz*.
- Revelo, A., de la Torre, E. M., Martínez, G. C., Baquero, M. C., & Casart, Y. Q. (2020). Evaluation of genomic DNA extraction methods for the identification of *Leptospira* spp. In bovine urine samples by PCR. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 31(2). <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i2.15522>
- Rojano, R., Basurto, F., de La Peña, A., & Ayanegui, M. (2009). *Evaluación de un ensayo inmuno-enzimático para el diagnóstico de leptospirosis*.
- Román, F. (2016). *Molecular identification of Leptospira spp., present in the dairy of Loja-Ecuador*. <https://www.researchgate.net/publication/319289806>
- Samrot, A. v., Sean, T. C., Bhavya, K. S., Sahithya, C. S., Chandrasekaran, S., Palanisamy, R., Robinson, E. R., Subbiah, S. K., & Mok, P. L. (2021). Leptospiral infection, pathogenesis and its diagnosis—a review. In *Pathogens* (Vol. 10, Issue 2, pp. 1–30). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020145>
- Sandoval, P., Avilés, M., Montesinos, R., Montalvo, M., & Tejeda, A. (2018). Estudio comparativo del diagnóstico de leptospirosis mediante PCR y MAT en el noroeste de México. *Acta Universitaria*, 28(4), 50–55. <https://doi.org/10.15174/au.2018.1625>
- Santana, F., De Oliveira, D., Ferreira, E., Costa, F., Ristow, P., Hanzen, M., & Lilenbaum, W. (2016). *Evaluación histológica e inmunohistoquímica de la colonización vaginal para leptospira en vacas con flujo vaginal positivos a PCR*. 163–167. www.onlinedoctranslator.com

- Schmidt, E., Obiegala, A., Imholt, C., Drewes, S., Saathoff, M., Freise, J., Runge, M., Jacob, J., Mayer-Scholl, A., Ulrich, R. G., & Pfeffer, M. (2021). Influence of season, population and individual characteristics on the prevalence of leptospira spp. In bank voles in north-west Germany. *Biology*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/biology10090933>
- Strutzberg, K., Tschentscher, A., Beyerbach, M., Homuth, M., & Kreienbrock, L. (2018). Passive surveillance of *Leptospira* infection in swine in Germany. *Porcine Health Management*, 4. <https://doi.org/10.1186/s40813-018-0086-5>
- Suárez, A., Cristina, Á., Parra, B., & Andrés, C. (2017a). Actualización de la Leptospirosis bovina en Colombia. In *kmilo215@hotmail.com* (Vol. 7, Issue 1).
- Suárez, A., Cristina, Á., Parra, B., & Andrés, C. (2017b). ACTUALIZACIÓN DE LA LEPTOSPIROSIS BOVINA EN COLOMBIA Actualización de la Leptospirosis bovina en Colombia BOVINE LEPTOSPIROSIS UPDATE IN COLOMBIA ABSTRACT. In *kmilo215@hotmail.com* (Vol. 7, Issue 1).
- Suwancharoen, D., Limlertvatee, S., Chetiyawan, P., Tongpan, P., Sangkaew, N., Sawaddee, Y., Inthakan, K., & Wiratsudakul, A. (2016). A nationwide survey of pathogenic leptospire in urine of cattle and buffaloes by Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method in Thailand, 2011–2013. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78(9), 1495–1500. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0493>
- Torres, M., Hernández Silvia, Agudelo, P., Arroyave, E., Zavala, J., & Puerto, F. (2016). Revisión actual de la epidemiología de la leptospirosis. In *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* (Vol. 54, Issue 5).
- Urbanskas, E., Karvelienė, B., & Radzijeuskaja, J. (2022). Leptospirosis: classification, epidemiology, and methods of detection. A review. In *BIOLOGIJA*. 2022 (Vol. 68, Issue 2).
- Urioste, V. (2021). Efectos de la infección natural por *Leptospira* spp. sobre la fisiología reproductiva de las vaquillonas holstein [Program de Posgrados, Universidad de la República de Uruguay]. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/36248/1/FV-34984.pdf>

- 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.
- Vincent, A. T., Schiettekatte, O., Goarant, C., Neela, V. K., Bernet, E., Thibeaux, R., Ismail, N., Khalid, M. K. N. M., Amran, F., Masuzawa, T., Nakao, R., Korba, A. A., Bourhy, P., Veyrier, F. J., & 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). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>
- Zeni, F. B. (2018). Estudio del comportamiento de pruebas diagnósticas serológicas, bacteriológicas y moleculares aplicadas en predios con sintomatología compatible con leptospirosis bovina.

11. Anexos

Anexo 1. Identificación de toma de muestras

INFORMACIÓN PARA ENVÍO DE LAS MUESTRAS											
NOMBRES DE QUIÉN ENVÍA LA MUESTRA: DANILO ARÉVALO TORRES						CORREO ELECTRÓNICO: di_arevalo@hotmail.com					
CÉDULA: 0104729165						TELÉFONO: 0968238334/072781413					
PROVINCIA: MORONA SANTIAGO						CANTÓN: GUALAQUIZA					
PARROQUIA: GUALAQUIZA						DIRECCIÓN: CAMAL MUNICIPAL GUALAQUIZA					
GEOREFERENCIA: 17 S X: 769731 Y: 9622211 Z: 811											
NÚMERO DE ANIMALES MUESTREADOS: 50						TOTAL DE MUESTRAS: 150					
CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS: CONGELADAS						ESPECIE: BOVINA					
TIPO DE MUESTRAS: SUERO SANGUÍNEO (S) - ORINA (O) - LAVADO UTERINO (U)											
No	RAZA	EDAD	ID MUESTRA	No	RAZA	EDAD	ID MUESTRA	No	RAZA	EDAD	ID MUESTRA
1	Mestizo	24 meses	S1	51	Mestizo	24 meses	O1	101	Mestizo	24 meses	U1
2	Mestizo	48 meses	S2	52	Mestizo	48 meses	O2	102	Mestizo	48 meses	U2
3	Charolais	18 meses	S3	53	Charolais	18 meses	O3	103	Charolais	18 meses	U3
4	Charolais	16 meses	S4	54	Charolais	16 meses	O4	104	Charolais	16 meses	U4
5	Charolais	24 meses	S5	55	Charolais	24 meses	O5	105	Charolais	24 meses	U5
6	Brown Swiss	48 meses	S6	56	Brown Swiss	48 meses	O6	106	Brown Swiss	48 meses	U6
7	Brown Swiss	18 meses	S7	57	Brown Swiss	18 meses	O7	107	Brown Swiss	18 meses	U7
8	Charolais	16 meses	S8	58	Charolais	16 meses	O8	108	Charolais	16 meses	U8
9	Mestizo	36 meses	S9	59	Mestizo	36 meses	O9	109	Mestizo	36 meses	U9
10	Charolais	36 meses	S10	60	Charolais	36 meses	O10	110	Charolais	36 meses	U10
11	Mestizo	14 meses	S11	61	Mestizo	14 meses	O11	111	Mestizo	14 meses	U11
12	Charolais	36 meses	S12	62	Charolais	36 meses	O12	112	Charolais	36 meses	U12
13	Charolais	36 meses	S13	63	Charolais	36 meses	O13	113	Charolais	36 meses	U13
14	Charolais	60 meses	S14	64	Charolais	60 meses	O14	114	Charolais	60 meses	U14
15	Charolais	18 meses	S15	65	Charolais	18 meses	O15	115	Charolais	18 meses	U15
16	Charolais	24 meses	S16	66	Charolais	24 meses	O16	116	Charolais	24 meses	U16
17	Charolais	18 meses	S17	67	Charolais	18 meses	O17	117	Charolais	18 meses	U17
18	Charolais	24 meses	S18	68	Charolais	24 meses	O18	118	Charolais	24 meses	U18
19	Mestizo	60 meses	S19	69	Mestizo	60 meses	O19	119	Mestizo	60 meses	U19
20	Charolais	14 meses	S20	70	Charolais	14 meses	O20	120	Charolais	14 meses	U20
21	Charolais	60 meses	S21	71	Charolais	60 meses	O21	121	Charolais	60 meses	U21
22	Mestizo	48 meses	S22	72	Mestizo	48 meses	O22	122	Mestizo	48 meses	U22
23	Mestizo	60 meses	S23	73	Mestizo	60 meses	O23	123	Mestizo	60 meses	U23
24	Charolais	24 meses	S24	74	Charolais	24 meses	O24	124	Charolais	24 meses	U24
25	Charolais	14 meses	S25	75	Charolais	14 meses	O25	125	Charolais	14 meses	U25
26	Brown Swiss	36 meses	S26	76	Brown Swiss	36 meses	O26	126	Brown Swiss	36 meses	U26
27	Charolais	24 meses	S27	77	Charolais	24 meses	O27	127	Charolais	24 meses	U27
28	Charolais	48 meses	S28	78	Charolais	48 meses	O28	128	Charolais	48 meses	U28
29	Charolais	14 meses	S29	79	Charolais	14 meses	O29	129	Charolais	14 meses	U29
30	Charolais	18 meses	S30	80	Charolais	18 meses	O30	130	Charolais	18 meses	U30
31	Charolais	18 meses	S31	81	Charolais	18 meses	O31	131	Charolais	18 meses	U31
32	Charolais	36 meses	S32	82	Charolais	36 meses	O32	132	Charolais	36 meses	U32
33	Charolais	60 meses	S33	83	Charolais	60 meses	O33	133	Charolais	60 meses	U33
34	Charolais	60 meses	S34	84	Charolais	60 meses	O34	134	Charolais	60 meses	U34
35	Charolais	18 meses	S35	85	Charolais	18 meses	O35	135	Charolais	18 meses	U35
36	Charolais	48 meses	S36	86	Charolais	48 meses	O36	136	Charolais	48 meses	U36
37	Charolais	18 meses	S37	87	Charolais	18 meses	O37	137	Charolais	18 meses	U37
38	Charolais	24 meses	S38	88	Charolais	24 meses	O38	138	Charolais	24 meses	U38
39	Brown Swiss	16 meses	S39	89	Charolais	16 meses	O39	139	Charolais	16 meses	U39
40	Charolais	24 meses	S40	90	Charolais	24 meses	O40	140	Charolais	24 meses	U40
41	Mestizo	36 meses	S41	91	Mestizo	36 meses	O41	141	Mestizo	36 meses	U41
42	Charolais	24 meses	S42	92	Charolais	24 meses	O42	142	Charolais	24 meses	U42
43	Charolais	48 meses	S43	93	Charolais	48 meses	O43	143	Charolais	48 meses	U43
44	Charolais	18 meses	S44	94	Charolais	18 meses	O44	144	Charolais	18 meses	U44
45	Holstein	16 meses	S45	95	Holstein	16 meses	O45	145	Holstein	16 meses	U45
46	Charolais	36 meses	S46	96	Charolais	36 meses	O46	146	Charolais	36 meses	U46
47	Mestizo	24 meses	S47	97	Mestizo	24 meses	O47	147	Mestizo	24 meses	U47
48	Mestizo	48 meses	S48	98	Mestizo	48 meses	O48	148	Mestizo	48 meses	U48
49	Charolais	24 meses	S49	99	Charolais	24 meses	O49	149	Charolais	24 meses	U49
50	Charolais	48 meses	S50	100	Charolais	48 meses	O50	150	Charolais	48 meses	U50

Anexo 2. Identificación de resultados de laboratorio

INFORMACIÓN DE BOVINOS MUESTREADOS														
NOMBRES DE QUIÉN ENVÍA LA MUESTRA: DANILO AREVALO TORRES							CORREO ELECTRÓNICO: di_arevalo@hotmail.com							
CÉDULA: 0104729165							TELÉFONO: 0968238334/072781413							
PROVINCIA: MORONA SANTIAGO							CANTÓN: GUALAQUIZA							
PARROQUIA: GUALAQUIZA							DIRECCIÓN: CAMAL MUNICIPAL GUALAQUIZA							
GEOREFERENCIA: 17 S X: 769731 Y: 9622211 Z: 811														
NÚMERO DE ANIMALES MUESTREADOS: 50							TOTAL DE MUESTRAS: 150							
CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS: CONGELADAS							ESPECIE: BOVINA							
TIPO DE MUESTRAS: SUERO SANGUÍNEO (S) - ORINA (O) - LAVADO UTERINO (U)														
No	RAZA	EDAD	ID MUESTRA	Batavia e	No	RAZA	EDAD	ID MUESTRA	PCR	No	RAZA	EDAD	ID MUESTRA	PCR
1	Mestizo	24 meses	S1		51	Mestizo	24 meses	O1	NEGATIVO	101	Mestizo	24 meses	U1	NEGATIVO
2	Mestizo	48 meses	S2		52	Mestizo	48 meses	O2	POSITIVO	102	Mestizo	48 meses	U2	NEGATIVO
3	Charolais	18 meses	S3		53	Charolais	18 meses	O3	NEGATIVO	103	Charolais	18 meses	U3	NEGATIVO
4	Charolais	16 meses	S4		54	Charolais	16 meses	O4	NEGATIVO	104	Charolais	16 meses	U4	NEGATIVO
5	Charolais	24 meses	S5		55	Charolais	24 meses	O5	NEGATIVO	105	Charolais	24 meses	U5	NEGATIVO
6	Brown Swiss	48 meses	S6		56	Brown Swiss	48 meses	O6	NEGATIVO	106	Brown Swiss	48 meses	U6	NEGATIVO
7	Brown Swiss	18 meses	S7		57	Brown Swiss	18 meses	O7	NEGATIVO	107	Brown Swiss	18 meses	U7	NEGATIVO
8	Charolais	16 meses	S8		58	Charolais	16 meses	O8	POSITIVO	108	Charolais	16 meses	U8	NEGATIVO
9	Mestizo	36 meses	S9		59	Mestizo	36 meses	O9	NEGATIVO	109	Mestizo	36 meses	U9	NEGATIVO
10	Charolais	36 meses	S10		60	Charolais	36 meses	O10	NEGATIVO	110	Charolais	36 meses	U10	NEGATIVO
11	Mestizo	14 meses	S11		61	Mestizo	14 meses	O11	NEGATIVO	111	Mestizo	14 meses	U11	NEGATIVO
12	Charolais	36 meses	S12		62	Charolais	36 meses	O12	NEGATIVO	112	Charolais	36 meses	U12	NEGATIVO
13	Charolais	36 meses	S13		63	Charolais	36 meses	O13	NEGATIVO	113	Charolais	36 meses	U13	NEGATIVO
14	Charolais	60 meses	S14		64	Charolais	60 meses	O14	NEGATIVO	114	Charolais	60 meses	U14	NEGATIVO
15	Charolais	18 meses	S15		65	Charolais	18 meses	O15	NEGATIVO	115	Charolais	18 meses	U15	NEGATIVO
16	Charolais	24 meses	S16		66	Charolais	24 meses	O16	NEGATIVO	116	Charolais	24 meses	U16	NEGATIVO
17	Charolais	18 meses	S17		67	Charolais	18 meses	O17	NEGATIVO	117	Charolais	18 meses	U17	NEGATIVO
18	Charolais	24 meses	S18		68	Charolais	24 meses	O18	NEGATIVO	118	Charolais	24 meses	U18	NEGATIVO
19	Mestizo	60 meses	S19		69	Mestizo	60 meses	O19	NEGATIVO	119	Mestizo	60 meses	U19	NEGATIVO
20	Charolais	14 meses	S20		70	Charolais	14 meses	O20	NEGATIVO	120	Charolais	14 meses	U20	NEGATIVO
21	Charolais	60 meses	S21		71	Charolais	60 meses	O21	NEGATIVO	121	Charolais	60 meses	U21	NEGATIVO
22	Mestizo	48 meses	S22		72	Mestizo	48 meses	O22	NEGATIVO	122	Mestizo	48 meses	U22	POSITIVO
23	Mestizo	60 meses	S23		73	Mestizo	60 meses	O23	NEGATIVO	123	Mestizo	60 meses	U23	NEGATIVO
24	Charolais	24 meses	S24		74	Charolais	24 meses	O24	NEGATIVO	124	Charolais	24 meses	U24	NEGATIVO
25	Charolais	14 meses	S25		75	Charolais	14 meses	O25	NEGATIVO	125	Charolais	14 meses	U25	NEGATIVO
26	Brown Swiss	36 meses	S26		76	Brown Swiss	36 meses	O26	NEGATIVO	126	Brown Swiss	36 meses	U26	NEGATIVO
27	Charolais	24 meses	S27	1/50	77	Charolais	24 meses	O27	NEGATIVO	127	Charolais	24 meses	U27	POSITIVO
28	Charolais	48 meses	S28		78	Charolais	48 meses	O28	NEGATIVO	128	Charolais	48 meses	U28	NEGATIVO
29	Charolais	14 meses	S29		79	Charolais	14 meses	O29	NEGATIVO	129	Charolais	14 meses	U29	NEGATIVO
30	Charolais	18 meses	S30		80	Charolais	18 meses	O30	NEGATIVO	130	Charolais	18 meses	U30	NEGATIVO
31	Charolais	18 meses	S31		81	Charolais	18 meses	O31	NEGATIVO	131	Charolais	18 meses	U31	NEGATIVO
32	Charolais	36 meses	S32		82	Charolais	36 meses	O32	NEGATIVO	132	Charolais	36 meses	U32	NEGATIVO
33	Charolais	60 meses	S33		83	Charolais	60 meses	O33	NEGATIVO	133	Charolais	60 meses	U33	NEGATIVO
34	Charolais	60 meses	S34		84	Charolais	60 meses	O34	NEGATIVO	134	Charolais	60 meses	U34	NEGATIVO
35	Charolais	18 meses	S35		85	Charolais	18 meses	O35	NEGATIVO	135	Charolais	18 meses	U35	NEGATIVO
36	Charolais	48 meses	S36		86	Charolais	48 meses	O36	NEGATIVO	136	Charolais	48 meses	U36	NEGATIVO
37	Charolais	18 meses	S37		87	Charolais	18 meses	O37	NEGATIVO	137	Charolais	18 meses	U37	NEGATIVO
38	Charolais	24 meses	S38		88	Charolais	24 meses	O38	NEGATIVO	138	Charolais	24 meses	U38	NEGATIVO
39	Brown Swiss	16 meses	S39		89	Charolais	16 meses	O39	NEGATIVO	139	Charolais	16 meses	U39	NEGATIVO
40	Charolais	24 meses	S40		90	Charolais	24 meses	O40	NEGATIVO	140	Charolais	24 meses	U40	NEGATIVO
41	Mestizo	36 meses	S41		91	Mestizo	36 meses	O41	NEGATIVO	141	Mestizo	36 meses	U41	NEGATIVO
42	Charolais	24 meses	S42		92	Charolais	24 meses	O42	NEGATIVO	142	Charolais	24 meses	U42	NEGATIVO
43	Charolais	48 meses	S43		93	Charolais	48 meses	O43	NEGATIVO	143	Charolais	48 meses	U43	NEGATIVO
44	Charolais	18 meses	S44		94	Charolais	18 meses	O44	NEGATIVO	144	Charolais	18 meses	U44	NEGATIVO
45	Holstein	16 meses	S45		95	Holstein	16 meses	O45	NEGATIVO	145	Holstein	16 meses	U45	NEGATIVO
46	Charolais	36 meses	S46		96	Charolais	36 meses	O46	NEGATIVO	146	Charolais	36 meses	U46	NEGATIVO
47	Mestizo	24 meses	S47		97	Mestizo	24 meses	O47	NEGATIVO	147	Mestizo	24 meses	U47	NEGATIVO
48	Mestizo	48 meses	S48		98	Mestizo	48 meses	O48	NEGATIVO	148	Mestizo	48 meses	U48	NEGATIVO
49	Charolais	24 meses	S49		99	Charolais	24 meses	O49	NEGATIVO	149	Charolais	24 meses	U49	NEGATIVO
50	Charolais	48 meses	S50		100	Charolais	48 meses	O50	NEGATIVO	150	Charolais	48 meses	U50	NEGATIVO

Anexo 3. Informe de análisis de laboratorio

Rótulo/DIIO	Fecha	Proyecto	Predio/lugar	Tipo Muestra	MAT 1:POS; 0:NEG	Canicola	Hardjo	Tarassovi	Sejroe	Bataviae	Wolffi	Pomona	EVALUADOR
S1	22/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S2	22/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S3	22/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S4	22/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S5	22/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S6	22/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S7	22/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S8	22/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S9	22/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S10	22/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S11	22/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S12	22/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S13	22/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S14	22/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S15	23/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S16	23/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S17	23/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S18	23/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S19	23/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S20	23/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S21	23/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S22	23/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S23	23/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S24	23/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S25	23/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S26	23/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S27	23/08/22	Bovino	UNL	suero	1					1/50			Jessica Zamora
S28	23/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S29	24/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S30	24/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S31	24/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S32	24/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S33	24/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S34	24/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S35	24/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S36	24/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S37	24/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S38	24/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S39	24/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S40	24/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S41	24/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S42	24/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S43	24/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S44	24/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S45	24/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S46	24/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S47	24/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S48	24/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S49	24/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora
S50	24/08/22	Bovino	UNL	suero	0								Jessica Zamora

Anexo 5. Certificación de traducción del abstract.



CERTIFICADO DE TRADUCCIÓN

Loja 16 de junio de 2023

Lic.
Nancy Correa Martínez.
CC.EE. Idioma Inglés.

CERTIFICA:

Haber traducido del Idioma Español al Idioma Inglés, el ABSTRACT de Proyecto de Investigación: "Para la obtención de Maestría en la facultad de AGROPECUARIA EN SANIDAD ANIMAL Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES". Elaborado por: El médico veterinario Danilo Ismael Arévalo Torres, portador de la cédula de identidad No. 0104729165, La técnica de traducción utilizada fue: Traducción Literal.

Lo certifico.

Atentamente



Lic. Nancy Correa Martínez
C.I. 1101706602