



Universidad
Nacional
de Loja

Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

Maestría en Reproducción Animal Mención Rumiantes

**Diagnóstico de leptospirosis genital en hembras bovinas faenadas
en el cantón Loja**

Trabajo de Titulación, previo a la
obtención del título de Magíster en Reproducción
Animal Mención Rumiantes

AUTOR:

Martha Elizabeth Carrión Sari

DIRECTOR:

MVZ. Jhuliana Katherine Luna Herrera Mg. Sc.

Loja - Ecuador

2024



unl

Universidad
Nacional
de Loja

POSGRADO

Maestría en
Reproducción Animal

Certificación

Loja, 14 de diciembre de 2023.

Mvz. Jhuliana Katherine Luna Herrera Mg. Sc
DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Certifico

Que he revisado y orientado todo el proceso de la elaboración del Trabajo de Titulación denominado: **Diagnóstico de leptospirosis genital en hembras bovinas faenadas en el cantón Loja**, de la autoría de la estudiante **Martha Elizabeth Carrión Sari**, con cédula de identidad Nro. **1103707079**, previo a la obtención del título de **Magíster en Reproducción Animal con mención en Rumiantes**, mismo que culminó el 20 de noviembre de 2022, cumpliendo con todos los requisitos estipulados por la Universidad Nacional de Loja, por lo que apruebo y autorizo para los fines correspondientes.



JHULIANA KATHERINE
LUNA HERRERA

Mvz. Jhuliana Katherine Luna Herrera, Mg. Sc.
DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Autoría

Yo, **Martha Elizabeth Carrión Sari**, declaro ser la autora 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:



Cédula de Identidad: 1103707079

Fecha: Loja, 04-03-2024

Correo electrónico: martha.e.carrion@unl.edu.ec

Celular: 0984224793

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

Yo, **Martha Elizabeth Carrión Sari**, declaro ser el autora del Trabajo de Titulación denominado “**Diagnóstico de leptospirosis genital en hembras bovinas faenadas en el cantón Loja**”, como requisito para optar el título de **Magíster en Reproducción Animal Mención Rumiantes**, 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 Digital 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, suscribo, en la ciudad de Loja, a los cuatro días del mes de marzo del dos mil veinte y cuatro.

Firma:



Autora: Martha Elizabeth Carrión Sari

Cédula: 1103707079

Dirección: Gonzanamá-Loja-Ecuador

Correo electrónico: martha.e.carrion@unl.edu.ec

Celular: 0984224793

DATOS COMPLEMENTARIOS

Directora del Trabajo de Titulación: MVZ. Jhuliana Katherine Luna Herrera Mg. Sc.

Dedicatoria

Dedico esta investigación a Dios porque él está conmigo todo el tiempo, dándome la fuerza necesaria para seguir luchando día tras día, superando todos los obstáculos que se presenten en mi camino.

A mis padres que han sabido darme su ejemplo de trabajo y honradez.

A mi esposo por su apoyo y paciencia en este proyecto de estudio.

A mis adorados hijos Juan Diego Y Juan David que son mi impulso e inspiración y a toda mi familia, por su infinito amor, cariño y comprensión, por acompañarme en las buenas y en las malas, por ayudarme a que éste sueño se haga realidad.

Martha Elizabeth Carrión Sari

Agradecimiento

Al culminar una de las metas planteadas, quiero utilizar este espacio para agradecer a Dios por su infinita bondad, a mis Padres, a mi querido esposo y mis adorados hijos por su apoyo y paciencia en este proyecto de estudio y a toda mi familia que ha estado conmigo incondicionalmente durante este tiempo.

A la Universidad Nacional de Loja, directivos y profesores por la organización del programa de Maestría en Reproducción Animal, que, en su visión de excelencia en Educación Superior, hicieron realidad mis sueños y aspiraciones. A mi tutora, la Mvz. Jhuliana Luna Mg. Sc., por dirigir y ofrecer su apoyo incondicional en la elaboración de este trabajo, al Dr. Victor Montes Ph. D, de la Universidad Técnica de Manabi, por su apoyo en el diagnostico de laboratorio del presente trabajo. A los profesores que, a lo largo de este tiempo de preparación académica, siempre me orientaron, guiaron y por haber mostrado verdadera capacidad al enseñar. Al personal administrativo del Camal Frigorifico de Loja S.A. Cafrilosa que me colaboraron con su autorización para llevar a cabo el presente trabajo investigativo. A todos mis amigos/as con los que he compartido tantas experiencias, aventuras, desveladas y triunfos; gracias a cada uno por ayudarme a crecer como persona.

Martha Elizabeth Carrión Sari

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	ix
Índice de anexos	ix
1. Título	1
2. Resumen	2
Abstract.....	3
3. Introducción	4
4. Marco Teórico	5
4.1. Etiología	5
4.1.1. Clasificación taxonómica y serológica	5
4.1.2. Clasificación genotípica	6
4.1.3. Características morfológicas, estructurales y microbiológicas	6
4.2. Transmisión.....	8
4.3. Patogenia de la leptospirosis.....	9
4.3.1. Fase leptospirémica	9
4.3.2. Leptospiruria	9
4.4. Signos Clínicos.....	9
4.5. Lesiones macro y microscópicas	10
4.6. Diagnóstico de la leptospirosis	12
4.6.1. Pruebas serológicas	12
4.6.1.1. Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT)	12
4.6.1.2. Inmunoabsorbancia Ligada a Enzima (ELISA)	13

4.6.1.3.	Hemaglutinación Indirecta	13
4.6.1.5.	Diagnóstico mediante pruebas moleculares (PCR)	14
4.7.	Tratamiento	14
4.8.	Medidas de prevención y control	15
4.9.	Epidemiología.....	16
4.9.1.	Relación Serovar – Hospedero.....	17
5.	<i>Metodología</i>	19
5.1.	Localización del estudio.....	19
5.2.	Diseño del estudio.	19
5.3.	Selección, tamaño de la muestra y tipo de muestreo.....	19
5.5.	Técnicas de recolección y procesamiento de muestras.....	19
5.6.	Diagnóstico de leptospirosis mediante PCR convencional.....	20
5.7.	Análisis de la información (análisis estadístico)	20
5.8.	Consideraciones éticas.....	20
6.	<i>Resultados</i>	21
6.1.	Características de los Animales Estudiados.....	21
6.2.	Detección de <i>Leptospira</i> spp. en genitales de hembras bovinas	21
7.	<i>Discusión</i>	22
8.	<i>Conclusiones</i>	25
9.	<i>Recomendaciones</i>	26
10.	<i>Bibliografía</i>	27
11.	<i>Anexos</i>	34

Índice de tablas

Tabla 1. Serocares de <i>Leptospira</i> spp. Identificados en los mamíferos.....	18
Tabla 2. Características de los animales muestreados	21
Tabla 3. Detección de <i>Leptospira</i> patógena en genitales de hembras bovinas	21

Índice de figuras

Figura 1. <i>Leptospira interrogans</i> cepa RGA, obtenida por microscopia electrónica de barrido. Tomado de <i>Leptospira</i> and leptospirosis.....	7
Figura 2. Nefritis Intersticial en riñón de buey con leptospirosis.....	11

Índice de anexos

Anexo 1. Hoja de Registro.....	34
Anexo 2. Imagenes de la toma de Muestras.....	35
Anexo 3. Certificado de traducción del Abstract	37

1. Título

“Diagnóstico de leptospirosis genital en hembras bovinas faenadas en el cantón Loja”

2. Resumen

La leptospirosis bovina es una enfermedad zoonótica, de curso agudo y de distribución mundial, producida por diversas serovariedades de *Leptospira* patógena, que influye en la economía de la industria pecuaria debido a los abortos, infertilidad y disminución de la producción de leche, produciendo pérdidas económicas significativas, por lo que el estudio de la leptospirosis genital resulta de gran importancia. De esta manera, los objetivos de ese trabajo fueron: 1). Detectar la presencia de *Leptospira* spp. en el tracto reproductor de hembras bovinas; y, 2). Determinar la frecuencia de leptospirosis genital en hembras bovinas faenadas en el cantón Loja. Para ello, se tomaron muestras de lavado uterino y aspirado folicular a 50 hembras bovinas faenadas, entre noviembre y diciembre del 2022. La detección de la bacteria se realizó por el método de PCR convencional para detectar la presencia del gen *hap1* de 262 pb, de *Leptospira* patógena. Finalmente, se detectó el material genético de la bacteria a partir de folículos ováricos de 4 vacas (8%), mientras que en las muestras de útero no se registraron resultados positivos. Los resultados constituyen una línea base para futuras investigaciones, que permitan comprender con mayor profundidad la patogenia de enfermedad y sus repercusiones a nivel reproductivo y la frecuencia con que se presenta, con el fin de establecer un programa de control organizado a nivel local y regional.

Palabras clave: folículo ovárico, leptospirosis genital, *Leptospira* spp., útero.

Abstract

Bovine leptospirosis is a zoonotic disease, which is of acute course and worldwide spreading, is produced by various serovars of pathogenic *Leptospira*, thus affecting the economy of the livestock industry due to abortions, infertility and decreased milk production, causing significant economic losses; therefore, the study of genital leptospirosis is of great importance. Hence, this paper's objectives were: 1). To detect the presence of *Leptospira* spp. in the reproductive tract of bovine females; and, 2). To determine the frequency of genital leptospirosis in bovine females slaughtered in the canton of Loja. For this purpose, it was taken samples of uterine lavage and follicular aspirate from 50 slaughtered bovine females between November and December 2022. The detection of the bacterium was performed through the conventional PCR method to detect the presence of the 262 bp hap1 gene from pathogenic *Leptospira*. Finally, the genetic material of the bacteria was detected from ovarian follicles of 4 cows (8%), while in the uterus samples no positive results were recorded. The results constitute a baseline for future research, which allows a deeper understanding of the pathogenesis of the disease and its repercussions at the reproductive level and the frequency with which it occurs in order to establish an organized control program at the local and regional levels.

Key words: ovarian follicle, genital leptospirosis, *Leptospira* spp., uterus.

3. Introducción

La falta de información de los productores ganaderos y médicos veterinarios sobre la presencia de enfermedades infecciosas reproductivas en el ganado bovino, y por ende formas de control y prevención, contribuyen en el incremento de pérdidas productivas y económicas dentro de la ganadería.

La leptospirosis es una enfermedad infectocontagiosa que en los rumiantes genera, entre otros, problemas reproductivos como abortos, retención placentaria, metritis, nacidos débiles, infertilidad y baja producción de leche (Rivera, 2001). Además, esta enfermedad es un grave problema de salud pública por ser de carácter zoonótico, lo que ocasiona pérdidas económicas debidas a las bajas laborales, pérdida de productividad, capacidad de trabajo, etc. (Ibrahim et al., 2022).

Recientemente se ha descrito a la leptospirosis genital bovina como un síndrome poco estudiado y consecuente de la bacteriemia dentro de la patogenia de la enfermedad, de esta forma, representa una enfermedad reproductiva silenciosa y crónica caracterizada por la muerte embrionaria que conduce a la repetición y la subfertilidad (Loureiro y Lilenbaum, 2020). y es posible que el aborto ocurriera durante una fase aguda al comienzo de la infección por leptospiras, la infección se vuelve crónica y los signos reproductivos pueden evolucionar hacia una subfertilidad prolongada (Ellis, 2015).

Por lo indicado anteriormente, en la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos específicos: 1). Detectar la presencia de *Leptospira* spp. en el tracto reproductor de hembras bovinas; y, 2). Determinar la frecuencia de leptospirosis genital en hembras bovinas faenadas en el cantón Loja. La información derivada de esta investigación servirá para comprender, en parte, las manifestaciones reproductivas de la enfermedad en bovinos, y a la vez para proponer estrategias de prevención y control de la enfermedad.

4. Marco Teórico

La leptospirosis es una enfermedad epidemiológicamente compleja, causada por bacterias patógenas de género *Leptospira* spp. (Céspedes, 2005). El agente patógeno infecta a los seres humanos y a diversos animales domésticos y silvestres, produciendo infecciones subclínicas o con numerosos cuadros clínicos (Boey et al., 2020). En el ganado bovino en particular, se presenta con una variedad de manifestaciones clínicas, que van desde síntomas agudos e hiperagudos caracterizados por fiebre, hematuria, hemoglobinuria, meningitis e incluso la muerte, hasta manifestaciones crónicas caracterizados por falla reproductiva (Masmela y Gutiérrez, 2021).

A diferencia de la enfermedad clínica aguda en humanos y animales domésticos, la leptospirosis en el ganado se presenta como una infección crónica, que conduce a problemas reproductivos como abortos, muerte embrionaria temprana y mortinatos, además causa importantes pérdidas económicas tanto en unidades de producción de leche como en las de carne (Bautista et al., 2019). Algunos estudios experimentales en bovinos desde hace ya algunas décadas han revelado que el aborto no ocurre en todos los animales infectados, pero que las leptospiras están presentes en todos los abortos (Rocha et al., 2018).

Recientemente, se describió un síndrome distinto denominado leptospirosis genital bovina (BGL) (Loureiro y Lilenbaum, 2020), que representa una enfermedad reproductiva silenciosa y crónica caracterizada por la muerte embrionaria (ED), que conduce a la repetición del estro y la subfertilidad (Aymée et al., 2021).

4.1. Etiología

4.1.1. Clasificación taxonómica y serológica

Leptospira pertenece a la familia Leptospiraceae, orden Spirochaetales, clase Spirochaetia y filo Spirochaetes (Krieg et al., 2010). La clasificación de la bacteria es compleja, incluso difícil de entender, ya que existen sistemas de clasificación basados en diferentes criterios: genéticos, fenotípicos o antigénicos (Barragán, S. (2016)

Se han descrito más de 300 serotipos de *Leptospira* spp. que se clasifican en 28 serogrupos de acuerdo a la similitud serológica por medio de la prueba de absorción y aglutinación cruzada (CAAT) (Góngora et al., 2022). La clasificación de serovares se basa en el uso de anticuerpos policlonales contra los lipopolisacáridos (LPS) de la pared bacteriana o la prueba de microaglutinación (MAT), que es una prueba estándar recomendada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) (Cosate et al., 2017). Además, de ser unidades sistémicas básicas, los serovares tienen importancia epidemiológica porque pueden asociarse con especies animales que han desarrollado relaciones comensales o levemente

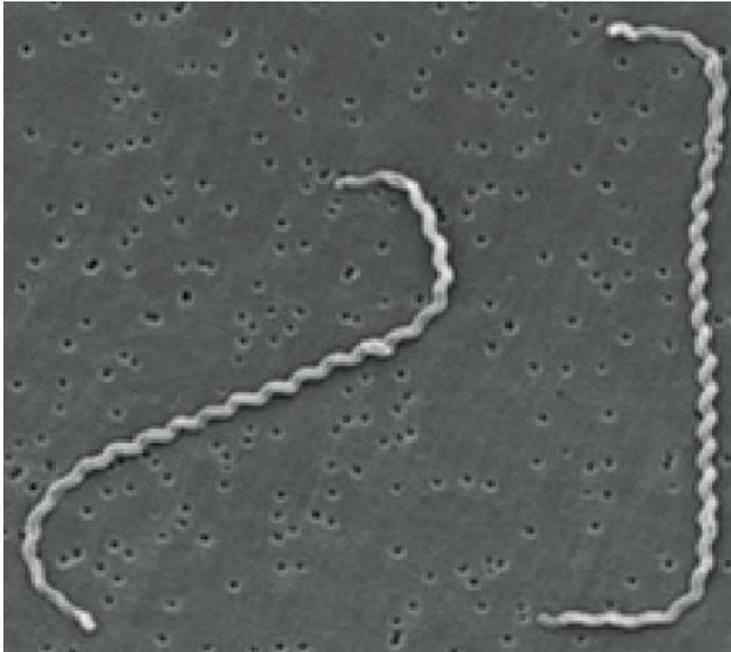
patógenas (OMS, 2008). Así por ejemplo, El ganado bovino sirve como hospedador de mantenimiento para las cepas del serogrupo Sejroe, particularmente el serovar Hardjo, que tiene dos tipos serológicamente similares, pero genéticamente distintos: Hardjoprajtino de la especie *L. interrogans* y *Hardjobovis* de la especie *L. borgpetersenii* (Loureiro & Lilenbaum, 2020). Por otro lado, el ganado bovino es hospedador ocasional de los serovares *Pomona*, *Grippotyphosa* e *Icterohaemorrhagiae*, especie *L. interrogans* (Alinaitwe et al., 2019; Ellis, 2015).

4.1.2. Clasificación genotípica

Las primeras *Leptospira* spp. en ser secuenciados fueron los de *L. interrogans* serovar Lai y *L. interrogans* serovar Copenhageni. El tamaño del genoma de *Leptospira* es de aproximadamente 5000 kb, el cual se encuentra dividido en dos secciones de 4400 kb y 350 kb con un contenido de GC de 35-41% (Góngora et al., 2022). De acuerdo al análisis del genoma completo, Vincent et al., (2019) descubrieron 64 especies de *Leptospira* que podían clasificarse en cuatro 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). En la actualidad, existen 72 especies de *Leptospira* que se clasifican en 3 clados de acuerdo a su grado de virulencia: P1 (patógenas), P2 (intermedias), S1 (saprófitas) (Abdullah et al., 2021).

4.1.3. Características morfológicas, estructurales y microbiológicas

Las leptospiras son bacterias espirales enrolladas en dirección a las manecillas del reloj, tienen forma semejante a la de un sacacorchos y se diferencian de otras espiroquetas por presentar ganchos en los extremos (figura 2). Son muy delgadas para ser observadas en un microscopio normal con tinciones de rutina, tienen una longitud de 6-20 micrómetros y un diámetro de 0,1 micrómetro (Faine et al., 1999) y muestran características ligeramente curvas en uno o ambos extremos (Bautista et al., 2019). Sin embargo, en condiciones de crecimiento desfavorables, las leptospiras pueden adoptar una representación esférica (Zuerner, 2010).



Las leptospiras están constituidas por un axostilo y un cuerpo. Sus estructuras están recubiertas por una membrana envolvente. El axostilo, tiene dos filamentos axiales que se insertan en la terminación del cuerpo protoplasmático, el cual está encargado de la movilidad del microorganismo, tienen movimientos de rotación, y no presentan flagelos; así mismo, tienen una membrana exterior muy fluida que rodea el cilindro del protoplasto y que, a su vez, promueve la motilidad bacteriana (Bautista et al., 2019; Zuerner, 2010). La pared celular contiene peptidoglicano que contiene diaminoácido alfa, ácido épsilon diaminopimérico. Así mismo, tienen dos flagelos o filamentos axiales útiles para la motilidad, que se prolongan desde los extremos de la célula y rodean el cilindro de protoplasma en el espacio periplásmico (Zuerner, 2010).

Las bacterias (leptospiras) son gramnegativas, móviles y totalmente aeróbicas (Bautista et al., 2019); para su crecimiento, la temperatura óptima es de 28 a 30 °C, el pH medio es de 7,2 a 7,6, y necesitan medios ricos en vitaminas, ácidos grasos de cadena larga y sales de amonio; el medio líquido más utilizado es Ellinghausen-Macaul-Johnson-Harris (EMJH) (Faine et al., 1999).

Crece lentamente en placas de agar y las especies saprofitas pueden formar colonias en 10 días, en comparación con las 6 a 8 semanas de las especies patógenas. Las colonias están dispersas, sin pigmentos, claras a oscuras formándose debajo de la superficie; la bacteria además es sensible a la radiación UV, el secado, la pasteurización, los cambios de pH (inactivación por debajo de 6 o por encima de 8), a varios antisépticos, desinfectantes y antibióticos (amoxicilina, penicilina y ampicilina) incluidos betalactámicos, rifampicina, tetraciclina, doxiciclina, cefalosporinas (cefotaxima, ceftizoxima), aminoglucósidos

(estreptomicina), macrólidos (eritromicina y azitromicina) y fluoroquinolonas (ciprofloxacina) (Bautista et al., 2019; Zuerner, 2010).

Por último, estas espiroquetas son sensibles al calor, la sequía, las bajas temperaturas y los cambios de pH. Pueden sobrevivir en agua dulce, principalmente si se mantienen durante unos 180 días. Durante la fisión binaria, se forma una membrana en la parte media del microorganismo, que le permite dividirse lateralmente. Son muy inestables a ambientes ácidos, condiciones secas y detergentes (Ortiz, et al., 2014).

Además, la supervivencia y persistencia de *Leptospira* son los primeros factores ambientales a considerar en cuanto a la resistencia. Cabe señalar que las bacterias patógenas pueden metabolizar la urea y, por lo general, persisten en la orina a un pH de 7 a 8. Otros factores que hacen que las bacterias estén intactas son la capacidad de soportar cambios en la presión osmótica y la motilidad bacteriana, lo que les permite escapar de un microambiente desfavorable y avanzar hacia uno más favorable (Burgos et al., 2020).

4.2. Transmisión

El patógeno puede ingresar a los organismos a través del contacto directo con los fluidos corporales antes mencionados o a través del contacto indirecto con suelo, agua y alimentos contaminados (Fávero et al., 2017). La *Leptospira* ingresa al cuerpo a través de la piel y mucosas, y se asienta en órganos llenos de líquido como el útero, los riñones y el hígado, así como en áreas con baja actividad de anticuerpos como el líquido ocular; posteriormente se excreta en la orina, leche materna, fluidos fetales y placentarios, secreciones uterinas y semen (Nally et al., 2018; Loureiro y Lilenbaum, 2020).

La transmisión horizontal directa es más común para los serotipos adaptados a la especie, como el serotipo Hardjo en el caso del ganado vacuno (Bautista et al., 2019); mientras que la transmisión horizontal indirecta es más importante en las infecciones por serotipos accidentales, ya que otras especies de huéspedes, como los cerdos y los animales salvajes, son reservorios de la bacteria (Correia et al., 2017). Finalmente, los animales también se enferman verticalmente a través de la placenta y la leche (Orjuela et al., 2022).

En infecciones por cepas adaptadas, la importancia de la contaminación por orina está bien documentada, pero la transmisión sexual se subestima sistemáticamente y no debe ignorarse (Loureiro y Lilenbaum, 2020). Las leptospiros se alojan en el riñón de los animales que son portadores temporales como el ganado vacuno y portadores permanentes como roedores (Gayathri et al., 2022).

Cuando se trata de biotecnología reproductiva, es bien sabido que *Leptospira* puede transmitirse por inseminación artificial, aunque, son sensibles a los antimicrobianos comúnmente utilizados para preparar el esperma diluido para la inseminación artificial, como la estreptomicina. De hecho, no está claro si la transmisión por semen tratado causará

infección en vacas susceptibles, también se ha planteado la hipótesis de que la transferencia de embriones puede transmitir la infección por *Leptospira* del donante al receptor (Loureiro y Lilenbaum, 2020).

4.3. Patogenia de la leptospirosis

4.3.1. Fase leptospirémica

La fase leptospirémica, anictérica o bacteriémica (Lau et al., 2018), es una etapa temprana (aguda) de infección caracterizada por la presencia del agente patógeno en la sangre; el agente puede llegar al torrente sanguíneo en cuestión de minutos por el movimiento tortuoso de los apéndices periplásmicos (Johnson, 2018). Esta fase ocurre después de la primera infección y se caracteriza por una diseminación hematológica que resiste la respuesta inmune.

La bacteriemia es diferente de la causada por otros agentes bacterianos típicos. La *Leptospira* puede camuflarse para evitar la respuesta inmune innata del huésped, causando daño antes de ser detectado (Samrot et al., 2021).

4.3.2. Leptospiruria

La leptospiruria, o fase ictérica, se caracteriza por ser una afección sistémica grave, si no se trata durante mucho tiempo, la leptospirosis se vuelve extremadamente invasiva y secreta grandes cantidades de enzimas que destruyen las membranas celulares. (Samrot et al., 2021). Además, para descomponer los componentes de la matriz extracelular, se necesita la producción de proteínas adicionales, como ortólogos de hemolisina y enzimas proteolíticas, como colagenasas, metaloproteasas y termolisinas. (Nascimento et al., 2004). La respuesta de sistema inmunitario es liberar una enorme cantidad de citosinas y atrayendo una gran cantidad de células fagocíticas, pese a ello esto no resulta muy efectivo para prevenir la leptospirosis y puede provocar una falla en uno o más órganos y muerte (Samrot et al., 2021).

La fase inmune comienza entre 7 y 10 días luego de la primera aparición de los síntomas y puede durar hasta 30 días (Asensio et al., 2018). Se caracteriza este periodo por daño tubular renal y nefritis intersticial, pérdida de potasio tubular renal y poliuria; También hay presencia de anticuerpos específicos contra bacterias que desaparecen de la sangre, pero persisten en órganos como el hígado, los pulmones, los riñones, el corazón, el cerebro y otros (Samrot et al., 2021).

4.4. Signos Clínicos

La forma que se presenta esta enfermedad es aguda y crónica en bovinos, la cual provoca ictericia, hemoglobinuria, anemia y aborto. (Hernández-Rodríguez et al., 2021). La presencia de *Leptospira* en el útero impide la implantación del embrión y otros eventos

tempranos de la gestación, así mismo se alteran los mecanismos de defensa, la actividad hormonal y el pH intrauterino, lo que permite la entrada de agentes infecciosos que desencadena una respuesta inflamatoria (Mosquera et al., 2022); La forma crónica de la leptospirosis bovina es causada por los efectos secundarios de la invasión bacteriana del cuerpo, que se manifiestan como infertilidad, aborto debido a la degeneración de la placenta y los efectos de la invasión bacteriana de los órganos reproductivos; las hembras bovinas en gestación pueden experimentar un aborto espontáneo, además, el signo principal, grave y mortal de la leptospirosis es la insuficiencia renal (20%) (Hernández-Rodríguez et al., 2021).

Las formas agudas y graves de leptospirosis (fiebre, ictericia, agua roja y muerte), son menos frecuentes y suelen estar asociadas a brotes esporádicos en terneros causados por serotipos irregulares. La infección accidental de serotipos en bovinos adultos por lo general provoca altas tasas de aborto en hatos infectados unas pocas semanas después de la fase aguda de la enfermedad por Pomona, Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae, los cuales son los serogrupos más comunes en infecciones ocasionales en bovinos, la transmisión involucra a cerdos, roedores y animales salvajes (Loureiro y Lilenbaum, 2020).

Aunque se parece al tipo agudo, la forma subaguda afecta con mayor frecuencia al ganado bovino adulto, los síntomas son más leves y la infección es recesiva (Loureiro y Lilenbaum, 2020).

La fase crónica es aparentemente silenciosa y, aunque en esta fase ocurren abortos, la infección suele ser subclínica y silenciosa, a menudo pasada por alto por el ganado. Como resultado de la invasión bacteriana, el aborto ocurre con frecuencia, con o sin degeneración placentaria, y se manifiesta como partos prematuros débiles o infectados (Masmela y Gutiérrez, 2021).

Por otra parte, la leptospirosis afecta a la producción de leche, provocando un descenso brusco, con la aparición súbita de fiebre, hinchazón de la ubre, anorexia, inmovilidad y con menos frecuencia, puede causar mastitis, que se caracteriza por la baja producción de leche amarillenta o decolorada y manchada de sangre (Szwako et al., 2015). Sin embargo, la infección en el ganado lechero puede manifestarse como síndrome de descenso brusco de la leche (Schafbauer et al., 2019).

4.5. Lesiones macro y microscópicas

La leptospirosis bovina puede causar anemia e ictericia, hemoglobinuria y sangrado subseroso y submucoso (Radostits et al., 2006). Puede causar úlceras y ablandar el revestimiento del estómago; en algunas investigaciones se han reportado otras alteraciones como el color ladrillo rojo del bazo, hiperemia a nivel pulmonar y la presencia de petequias en mucosas. En casos severos puede ocurrir edema pulmonar y enfisema (Buen de Arguero, 2001).

Romero y Veloza (2014), mencionan que, en el ganado bovino adulto, los signos son fiebre, abortos, disminución de la fertilidad o disminución en la producción de leche, la misma que puede ser espesa, amarilla y teñida de sangre. Así mismo, algunas serovariedades provocan abortos tardíos, mortinatos y aumento de mortalidad neonatal.

Muchos bovinos asintomáticos en el matadero aparecen con manchas blancas en los riñones, lo que se ha llamado "leucoplasia", como el resultado de una infección bacteriana previa, sin embargo, no debe considerarse a esta manifestación como específica de la leptospirosis (Radostits et al., 2006). La mayoría de los fetos bovinos abortados están autolisados por lo que no pueden demostrarse lesiones ni bacterias. Algunas a veces se puede distinguir ictericia, líquido sanguinolento en cavidades, hemorragia y esplenomegalia (Follmer et al., 2017).



Figura 1. Nefritis Intersticial en riñón de buey con leptospirosis. Tomado de *BovinePathology, a text and color atlas* (p.184), por Buergett et al., 2017, CABI.

Por otra parte, un estudio con perras infectadas experimentalmente mostró que *Leptospira* daña el endometrio, induce una respuesta inflamatoria y la expresión de proteínas de la matriz extracelular, lo que conduce a la detención embrionaria y al posterior fracaso reproductivo. Además, se encontró una correlación entre la muerte embrionaria temprana y la serorreactividad al serotipo Bratislava (adaptado a caballos) en yeguas. En bovinos la presencia de la bacteria en el útero causa inflamación, alterando el ambiente uterino y afectando la supervivencia o implantación del embrión y la invasión directa de la bacteria en el embrión resultaría en daño severo y posterior muerte (Loureiro u Lilienbaum, 2020).

Además, el estudio realizado por Di Azevedo et al. (2021), mencionan por primera vez la presencia de *Leptospira* spp. en los ovarios de vacas asintomáticas infectadas de forma natural, lo que indica que existe la posibilidad de infección del ovocito, pero esto no se ha descrito claramente. Así mismo, en el aparato reproductor de búfalas a nivel de ovario se ha

observado quistes foliculares atrofia y cuerpo lúteo persistente, en oviductos fibroplasia y salpingitis (Pérez-Gil, 2023).

4.6. Diagnóstico de la leptospirosis

Actualmente, la leptospirosis se diagnostica mediante métodos directos como el cultivo bacteriano y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); sin embargo, no se han dejado de lado métodos de serología, principalmente la prueba de aglutinación microscópica (MAT), esto sobretodo porque los títulos elevados de IgM e IgG son fácilmente detectables (Loureiro y Lilenbaum, 2020).

La selección de pruebas a ejecutar depende del propósito del análisis, la disponibilidad y la experiencia para realizar las pruebas (OIE, 2021).

4.6.1. Pruebas serológicas

La serología como herramienta diagnóstica de la leptospirosis bovina crónica suele presentar inconvenientes. Aunque, es claramente útil para el diagnóstico colectivo de rebaños, se considera que un rebaño está infectado cuando los animales serorreactivos constituyen el 10 % del rebaño, pero no es una buena forma de detectar individuos infectados (Gonzalez y Rivera, 2015). De esta manera, los animales infectados pueden abortar o convertirse en portadores genitales (detectados por PCR) y aun así tener títulos muy bajos que no pueden ser detectados por MAT (García, 2002).

Las pruebas serológicas pueden realizarse y confirmarse al establecer el diagnóstico clínico, la prevalencia y realizar estudios epidemiológicos. Por lo tanto, aunque los anticuerpos contra la *Leptospira* aparecen pocos días después de la infección y persisten durante semanas, meses o incluso años, los títulos de anticuerpos pueden disminuir a niveles indetectables en animales crónicamente infectados (Desa et al., 2021; OIE, 2021).

4.6.1.1. Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT)

Esta prueba es el test serológica de referencia para diagnosticar leptospirosis (OIE, 2021), e implica mezclar diluciones seriadas del suero animal con cultivos de diferentes serovares para buscar anticuerpos de aglutinación en ese suero. Esta prueba utiliza antígenos vivos, por lo que, se deben utilizar cepas que representen todos los serogrupos en la región para ampliar la sensibilidad. La muestra del paciente debe examinarse 7 días después de la enfermedad cuando los anticuerpos aparecen por primera vez en el suero. Una pequeña gota de la mezcla de reacción colocada en un portaobjetos de vidrio o la placa de microtitulación vista a través de un microscopio de campo oscuro se pueden usar para leer el MAT (Gayathri et al., 2022).

4.6.1.2. Inmunoabsorbancia Ligada a Enzima (ELISA)

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) es un método serológico para la detección rápida y precisa de anticuerpos para el diagnóstico de la leptospirosis. La prueba puede detectar anticuerpos anti-*Leptospira* tan pronto como 4-5 días después del inicio de los síntomas. Además, puede detectar anticuerpos específicos, ya sea IgM o IgG, y es más rápido y más sensible que la prueba MAT.

Los antígenos ELISA deben obtenerse de cultivos de *Leptospira* (Gayathri et al., 2022). Por otra parte, existen limitaciones de esta técnica, la más importante es que sólo detecta anticuerpos específicos de género y no es adecuada para detectar serogrupos o serovares, provocando que la prueba no sea fiable y puede resultar negativa, también, puede resultar mayor ruido de fondo, ya que ciertas proteínas que se encuentran en la muestra (además del antígeno de interés) pueden unirse a la placa (Céspedes, 2005).

4.6.1.3. Hemaglutinación Indirecta

Esta prueba puede detectar anticuerpos IgG e IgM totales, por lo que no es posible saber si es una infección previa o una infección reciente, tiene una sensibilidad del 92 % y una especificidad del 97 % en comparación con la prueba MAT, lo que es ventajoso si desea realizar estudios de seroprevalencia. Si los anticuerpos están presentes en el suero del paciente, se produce la hemaglutinación y los glóbulos rojos no sensibilizados se utilizan como controles para las reacciones inespecíficas (Cornejo, 2018).

4.6.1.4. Diagnóstico microbiológico

Es un método más específico para demostrar la presencia de Leptospiras, se lo debe realizar con personal experimentado, siempre que no exista residuos de antibióticos, autólisis avanzada del tejido y que haya rapidez en el manejo de los tejidos para su cultivo posteriormente a su recolección y la muestra de orina que tenga un Ph apropiado. En el caso que no se logre enviar inmediatamente las muestras al laboratorio para su cultivo, estas se las debe almacenar entre 2-5°C para impedir el crecimiento de otras bacterias y la autólisis del tejido. Así mismo para enviar las muestras, se debe utilizar como medio de transporte una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 1%, con 5-fluorouracilo a una concentración de 100-200 µg/ml (OMSA,2023).

El periodo que se necesita para diagnosticar un cultivo positivo depende del serotipo y la cantidad de organismos en la muestra; los serotipos, como Pomona y Grippotyphosa, son de baja sensibilidad estos muestran resultados positivos entre 7 y 10 días después de la inoculación. Otros serovares como Hardjo y Bratislava pueden durar un tiempo mas prolongado. Se observan cada 1-2 semana los cultivos con un microscopio de campo oscuro.

Este método necesita de varias semanas de incubación siendo esta una desventaja para su diagnóstico (Costa, Ravara & Cota, 2006).

4.6.1.5. Diagnóstico mediante pruebas moleculares (PCR)

Actualmente, la leptospirosis también se diagnostica mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que brinda alta sensibilidad y especificidad, es una herramienta primordial del diagnóstico directo para descubrir portadores individuales de leptospiras en el ganado (Loureiro & Lilenbaum, 2020). La PCR en tiempo real, también conocida como tecnología SYBR Green o Taq-man, es más rápida que la PCR convencional y menos sensible a las contaminaciones. (Picardeau, 2013).

Estos ensayos se dividen en dos categorías basadas en la detección de genes que se encuentran comúnmente en bacterias, como *gryB*, *rrs* (gen 16S rRNA) y *secY*, o la detección de genes específicos de especies patógenas del género *leptospira* por ejemplo *lipL32*, *ligA* y *ligB* (Thaipadungpanit et al., 2011). Estas pruebas no pueden identificar el serotipo infectante, aunque algunos grupos de cebadores pueden permitir una identificación más precisa a nivel de especie o de cepa cuando se secuencian los amplicones de PCR. Para analizar las muestras de animales se utilizan los cebadores mas adecuados de la PCR, basados en el gen *LipL32* (OIE, 2021).

Las muestras pueden dar lugar a resultado falsos negativos por la presencia de inhibidores de la amplificación especialmente por la contaminación de las muestras de animales por heces o autólisis. La presencia de inhibidores de la amplificación en la muestra puede dar lugar a resultados falsos negativos, especialmente en muestras con autólisis o muestras contaminadas con heces. Para el control de calidad de las pruebas de PCR se debe prestar especial atención para evitar la contaminación del material en el laboratorio (McCreedy & Callawayth, 1993). El manejo de muestras para PCR es esencial, por lo que debe ser apropiada para tejidos, fluidos y especies animales (OIE, 2021). En su mayor parte los protocolos están diseñados para muestra de orina y tejido sin embargo la prueba PCR se pueden adaptar fácilmente a muestras de fluido vaginal, La mayoría de los protocolos están diseñados para muestras de orina o tejido, pero la PCR se ajusta fácilmente a muestras de fluido vaginal, esto es fundamental para poder identificar a las portadoras vaginales e investigar su relación con trastornos reproductivos (Loureiro y Lilenbaum, 2020).

4.7. Tratamiento

Los agentes antimicrobianos juegan un papel importante en los programas de control de la leptospirosis. Al principio de un programa, los antibióticos se utilizan con frecuencia para disminuir el número de animales infectados, así como para reducir la producción de orina y la transmisión de ganado a ganado.

El tratamiento de esta enfermedad tiene dos objetivos importantes: el controlar la infección antes de que sea irreversible el daño hepático y renal, y controlar la leptospiruria de los animales infectados (Radostits et al., 2006). La susceptibilidad de la *Leptospira* a diferentes antibióticos, la dihidroestreptomicina continua siendo el antibiótico más recomendado para el tratamiento de la Leptospirosis (Loureiro y Lilenbaum, 2020). Para casos agudos de leptospirosis en bovinos se recomienda utilizar oxitetraciclina de 10 – 25 mg/kg de peso corporal IM, dos veces al día y dihidroestreptomicina de 12,5 mg/kg (Masmela y Gutiérrez, 2021; Radostits et al., 2006). Sin embargo, en algunos casos, es necesario utilizar la misma dosis una o dos veces al día durante 3 días seguidos (Loureiro y Lilenbaum, 2020).

Además, se puede administrar una transfusión de sangre (5-10 l/450 kg) se puede realizar al ganado con leptospirosis aguda que se manifiesta con anemia hemolítica, palidez, debilidad y taquicardia (Radostit et al., 2006).

4.8. Medidas de prevención y control

El control de la leptospirosis bovina es crucial para evitar la infección de animales y ganado, además reducir las pérdidas económicas. (González y Rivera, 2015). El control de infecciones con serotipos no adaptados se basa en reducir el contacto entre serotipos, y los animales que sirven como huéspedes que pueden ser domésticos o salvajes (García, 2002).

Para identificar y eliminar a los portadores es dificultoso ya que algunos animales que dan positiva en MAT no eliminan *Leptospira* en la orina, por lo tanto no se consideran portadores, y requieren realizar una nueva prueba para detectar el organismo en la orina. Cuando los animales dan resultados positivos se consideran portadores y deben recibir el respectivo tratamiento (Radostits et al., 2006).

La detección y eliminación de los portadores es complicado, algunos animales con una prueba MAT positiva no excretan *Leptospira* en la orina, por lo que no pueden considerarse como portadores, y se requiere repetir la prueba de orina para detectar el organismo. En la práctica, los animales serológicamente positivos se consideran portadores y deben seguir un tratamiento (Radostits et al., 2006).

Por otra parte, la vacunación es un factor protector. A pesar de algunas limitaciones de las vacunas actualmente disponibles, siguen siendo el medio más efectivo y económico para reducir el deterioro reproductivo y las pérdidas económicas correspondientes a los agricultores debido a la leptospirosis (Loureiro y Lilenbaum, 2020).

Se han creado vacunas contra serotipos específicos de *Leptospira interrogans* como Hardjo, Pomona, Canicola, Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae; sin embargo, tienen algunos inconvenientes, como protección subóptima, necesidad de dosis de refuerzo, protección insuficiente frente a un gran número de serotipos circulantes y efectos

secundarios. Además, la vacuna tiene disponibilidad limitada en ciertas áreas geográficas y rara vez se aprueba en países desarrollados (Hernández-Rodríguez et al., 2021).

Debido a que las vacunas contra la infección por el serotipo Hardjo bovis solo estimulan la inmunidad durante un breve período de tiempo (menos de dos meses), no parecen ser eficaces. Esto sugiere que la vacunación semestral o anual es suficiente en áreas de alta incidencia (Masmela y Gutiérrez, 2021).

4.9. Epidemiología

Se considera esta enfermedad como antropozoaica, lo que quiere decir que perjudica tanto a animales, ya sean mamíferos domésticos, animales salvajes, animales de sangre fría y humanos. La serie de casos de leptospirosis revela deficiencias en la prevención primaria de la enfermedad, así como en su implementación y control. La leptospirosis es una enfermedad reemergente a nivel mundial con una alta prevalencia en diferentes especies y un alto riesgo de infección. Por tanto, se encuentra entre las 35 principales causas de muerte a nivel mundial, recalando su especial preocupación en el ámbito de la salud pública, ya que si no se controla este problema puede provocar mortalidad humana y animal y graves pérdidas económicas (Valverde-Latorre et al. , 2021).

La gravedad del problema está relacionada con factores climáticos y ambientales, así como con la excreción de *Leptospira* en la orina del animal huésped (típicamente roedores). Los seres humanos se infectan por contacto de la piel o las mucosas con agua dulce contaminada y el período de incubación dura unos 10 días. La exposición también puede ocurrir en un ambiente que ha sido contaminado. Sin embargo, las infecciones por mordeduras de animales son poco comunes (Campos, 2014).

Para determinar con qué frecuencia ocurre la infección por *Leptospira* spp, se han creado varios estudios, de esa forma, en América del Norte se han reportado tasas de seropositividad notificadas entre el 34 % el 65 % (Fang et al., 2014), mientras que en los países europeos se han reportado seroprevalencias entre el 25% al 65 % (Subharat et al., 2012). En los países de América Central y América del Sur reportaron seroprevalencias de 88,2% y 35% (Yepes et al., 2022). Finalmente, en Ecuador se han registrado seropositividad desde el 57,38% y hasta el 74,83% en las provincias de Manabí y Loja, respectivamente, siendo identificado con más frecuencia el serotipo Pomona (Burgos et al., 2020; Román et al., 2022).

Cuando se trata de *Leptospira* spp, para Luna (2019), existen numerosos factores de riesgo asociados que se deben considerar: los factores dependientes del hospedador, como el estado inmunitario, la gestación y la edad, respecto a esta última, la mayor frecuencia de excreción de *Leptospira* en la orina aparece en terneros, mientras que las vacas mayores de 3 años no son leptospirúricas.

Algunos animales que son hospederos naturales de un serovar específico, rara vez muestran síntomas de enfermedad frente a ese serovar, pero puede desarrollar síntomas si son infectados con otro serovar, lo que implica que la *leptospira* provoca una inmunidad de tipo humoral que solo protege frente al serovar infectante, lo que significa de que estos animales inmunes pueden ser la fuente de infección (Rodríguez, 2011). Esta enfermedad sucede como consecuencia de la respuesta inmune del huésped hacia los organismos, una vez que las leptospiras se unen a la células huésped, se liberan citoquinas (interleucina-6, interleucina-10 y TNF- α) y péptidos (AMP) para impedir los daños invasivos sufridos por las bacterias (Samrot et al., 2021).

En los factores del medio, depende de la raza del ganado y del tipo de cría. Por ejemplo, las vacas lecheras tienen una mayor incidencia y un peor pronóstico porque a menudo se crían en sistemas más hacinados que promueven su propagación, y los terneros se separan después del parto y se alojan en otro lugar (Sheen y Riesco, 2002). Los núcleos primarios (formado por los padres e hijos) son sensibles y susceptibles cuando se introducen en animales no expuestos durante la primera gestación, por lo que la mayor tasa de infección se presenta a los 2-3 años de edad (Ancha y Szyfres, 2001).

Además, los trópicos tienen muchas particularidades que afectan la aparición de infecciones y la gravedad de la enfermedad. Además de aspectos como la geografía y el clima o la topografía, factores como las prácticas de manejo y cría, la frecuencia de la asistencia veterinaria, etc. también afecta la prevalencia general y la distribución de los serotipos (Muyulema, 2020).

Los animales alimentados con ensilaje de granos como suplemento, puede provocar una mayor disminución del pH a un nivel ácido, lo que se refleja en la excreción de pequeñas cantidades de *Leptospira* en la orina (Sandow y Ramírez, 2005). En la cría de ganado, se supone que la leptospirosis es más común en estos animales que en el ganado vacuno cuando las terneras se separan de sus madres en las primeras etapas de la industria láctea; una vez introducidos en la explotación, se convierten en un factor de alto riesgo (Bentancur-Hurtado et al., 2013).

4.9.1. Relación Serovar – Hospedero

La epidemiología de la leptospirosis se puede entender más fácilmente dividiéndola en dos grandes categorías: leptospirosis adaptada al huésped y no adaptada. Los animales infectados con serotipos microbianos adaptados al huésped son huéspedes de mantenimiento o "huéspedes de reserva". La exposición de animales susceptibles a serotipos incompatibles con el huésped puede provocar una enfermedad incidental o accidental.

Tabla 1.

Serovares de Leptospira spp. Identificados en mamíferos

Hospederos	Serovares
Roedores	Icterohaemorrhagiae, Pomona, Canicola, Ballum, Castelloni, Hardjo, Bartislava, Tarassovi, Pyrogenes, Grippotyphosa-Valbuzzi.
Caninos	Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Bartislava, Grippotyphosa, Pyrogenes, Tarassovi, Ballum, Autumnalis Y Sejroe.
Felinos	Canicola, Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Muenchen, Bataviae, Castelloni, Mangus, Panamá, Cynopter, Pomona Y Grippotyphosa
Ovinos y caprinos	Hardjo, Pomona, Grippotyphosa Ballum
Equinos	Hardjo, Pomona, Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Sejroe Y Autumnalis.
Porcinos	Pomona, Tarassovi, Grippotyphosa, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Muenchen Y Batislava.
Bovinos	Hardjo, Pomona Y Grippotyphosa.
Humanos	Icterohaemorrhagiae, Hardjo, Pomona, Bataviae, Canicola Y Autumnalis.

Nota. Esta tabla muestra los hospederos y serovares identificados en los mamíferos. Adaptación de revisión actual de la epidemiología de la leptospirosis (p.622), por Torres-Castro et al, 2017

Un individuo de mantenimiento es aquel que asegura que la transmisión de leptospiras patógenas en el medio ambiente sin necesidad que intervenga ningún huésped ocasional. Por tanto, la población de mantenimiento actúa como reservorio continuo de un serovar, y en ecosistema, por medio de la contaminación del agua, suelo y alimentos (Romero-Vivas y Falconar, 2016).

5. Metodología

5.1. Localización del estudio

El trabajo de campo se realizó en las instalaciones del Camal Frigorífico Loja S.A. “CAFRILOSA”, que se encuentra ubicado en la parroquia Sucre, barrio Turunuma, Av. Turunuma y Granada, al norte de la ciudad de Loja. Los animales que se faenan en este establecimiento proceden sobre todo de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe, y llega un número aproximado de 140 hembras bovinas para ser faenadas mensualmente. El diagnóstico se realizó en el Laboratorio de *Leptospira* de la Universidad Técnica de Manabí, cantón Santa Ana.

5.2. Diseño del estudio.

La presente investigación es un estudio observacional de tipo transversal, y permitió diagnosticar leptospirosis genital en vacas faenadas en el camal del cantón Loja

5.3. Selección, tamaño de la muestra y tipo de muestreo.

La muestra de estudio fueron todos los aparatos reproductivos de hembras bovinas en edad reproductiva mayores a dos años, que se faenaron en el camal frigorífico Loja S.A. del cantón Loja, durante el periodo diciembre del 2022 a enero 2023. Las muestras fueron tomadas durante cuatro semanas seguidas todos los días lunes, a partir del 19 de diciembre del 2022 hasta el 09 de enero del 2023. Por lo antes escrito el tipo de muestreo fue no probabilístico hasta obtener un número de 50 muestras de lavado uterino y 50 muestras de aspirado folicular.

5.4. Recolección de Información

Se hizo mediante el uso de registros para rescatar información como la procedencia, raza y edad aproximada. Los grupos etarios, se construyeron por rangos de edad, constituidos entre 1 a 3 años, 4 a 6 años y 7 a 9 años, además, se registró el cantón de procedencia.

5.5. Técnicas de recolección y procesamiento de muestras

Para coleccionar las muestras de lavado uterino, se introdujo de 40 a 50 ml de solución salina fisiológica dentro del cuerpo uterino con ayuda de una jeringa unida a una sonda Foley; posterior a un masaje del útero se recogió el líquido mediante aspiración (Arévalo, 2022), y se transfirió a un tubo Falcom de 15 ml, rotulado con el número del animal.

Es importante mencionar que el 76 % de los úteros empleados para la toma de muestra presentaron signos de inflamación (presencia de exudados sanguinolentos, de color

marrón oscuro y malolientes, útero agrandado y cuernos uterinos con una coloración cianótica)

Por otro lado, mediante aspiración folicular se extrajo líquido (0,5 ml) para transferir a los tubos eppendorf, rotulados con el número del animal.

5.6. Diagnóstico de leptospirosis mediante PCR convencional

El material genético obtenido a partir de las muestras de líquido folicular y lavado uterino se analizó por medio de la prueba PCR convencional para diagnosticar la presencia o ausencia del gen *hap1* de 262 pb, relacionado 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.

5.7. Análisis de la información (análisis estadístico)

La información obtenida de las variables de estudio respecto al diagnóstico de leptospirosis se expresó en porcentajes haciendo uso de tablas de frecuencia mediante estadística descriptiva.

5.8. Consideraciones éticas

En este estudio las muestras se tomaron posterior a la faena de los animales. Los animales fueron manipulados de acuerdo a las normas que regulan el cuidado y uso de animales en investigaciones científicas según el Código Orgánico Ambiental (ROS N°983, Ecuador).

6. Resultados

6.1. Características de los Animales Estudiados

Más del 50% de las vacas se incluyeron en el segundo grupo etario (de cuatro a seis años). El 82% fueron procedentes del cantón Loja, el 8% del cantón de Zamora y el 10% restante del cantón Cumbaratza. En la tabla 5 se muestran estas características y la distribución de los animales de acuerdo al cantón y parroquia de procedencia.

Tabla 2.

Características de los animales muestreados

Características	Frecuencia	%
Edad		
1 a 3 años	20	40%
4 a 6 años	26	52%
7 a 9 años	4	8%
Procedencia		
Cantón Loja		
El Valle	20	40%
San Sebastián	8	16%
Malacatos	6	12%
Sucre	2	4%
Jimbilla	2	4%
Yangana	1	2%
Carigan	1	2%
Cantón Zamora		
Imbana	4	8%
Sabanilla	1	2%
Cantón Cumbaratza		
Cumbaratza	5	10%

6.2. Detección de *Leptospira* spp. en genitales de hembras bovinas

Con respecto a la detección de *Leptospira* patógena mediante PCR convencional, el 8% de los animales resultaron positivos, se identificó la bacteria en muestras de aspirado folicular de cuatro animales, de los cuales tres fueron procedentes del cantón Loja y uno del cantón Zamora, de una edad aproximada de 4,5 a 6 años. Sin embargo, ningún animal resultó positivo en la muestra uterina (tabla 3).

Tabla 3.

Detección de Leptospira patógena en genitales de hembras bovinas

Tipo de muestra	Total		Positivo		Negativo	
	N	%	N	%	N	%
Folículo ovárico	50	100,00	4	8,00	46	92,00
Utero	50	100,00	0	0,00	50	100,00

7. DISCUSIÓN

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa y bacteriana causada por la espiroqueta patógena del género *Leptospira*. Su curso es agudo y se caracteriza por la aparición repentina de agalactia en el ganado lechero adulto, ictericia y hemoglobinuria, fundamentalmente en los animales jóvenes. También puede ocurrir de forma crónica, lo que resulta en abortos de mortinatos, nacimientos de animales débiles o prematuros e infertilidad (González y Rivera, 2015).

La leptospirosis es una enfermedad que causa impacto negativo en la reproducción, a pesar de lo cual, son escasas las investigaciones que buscan detectar la colonización bacteriana de los órganos genitales por *Leptospira* spp.; las lesiones producidas a nivel uterino y ovárico se encuentran presentes en distintas serovariedades de *Leptospira*, representando un problema para las hembras contagiadas (Mosquera- Escobar, 2022). De este modo, el presente estudio fue diseñado con la finalidad de diagnosticar leptospirosis genital en hembras bovinas faenadas en el cantón Loja.

La evidencia serológica de la circulación de la bacteria ha permitido conocer resultados preocupantes sobre el nivel de infección en Ecuador y otros países de la región y el mundo. Es así que en Ecuador se han reportado prevalencias altas como del 52,2% (Burgos, et al., 2019); por otro lado, según González y Rivera (2015) la frecuencia de la leptospirosis en Venezuela entre los años 2005 y 2013 se situó en 80,17%. En lo que se refiere a la seroprevalencia de *Leptospira* spp., en algunos países de sudamérica se ha reportado desde el 15% hasta el 70% en bovinos (Monroy-Díaz et al., 2020), por ejemplo en Colombia se ha encontrado un 54,2% (Pulido-Medellín et al., 2017); en Perú 15% (Llanco et al., 2017); y en Brasil 45,42% (Pinheiro & Vasconcellos, 2009).

En la presente investigación el 8% de los animales en estudio fueron positivos a la presencia de *Leptospira* spp. en el tracto reproductor (aspirado folicular) mediante la prueba de PCR, sin embargo, en zonas en donde los datos de seroprevalencia son más altos, la identificación del patógeno ha sido también más frecuente, así por ejemplo, Cabral (2018), detectó, en el estado de Rio de Janeiro el 70 % de presencia de *Leptospira* en folículos ováricos de vacas no preñadas.

Estos hallazgos permiten comprender la alteración de la función reproductiva de los animales que resultaron positivos, así pues según, Pereira (2023), la presencia de la bacteria a nivel ovárico se asocia con la calidad de los ovocitos y su capacidad de desarrollarse hasta

la etapa embrionaria, logrando reducir la competencia del desarrollo del ovocito disminuyendo la eficiencia de producción de embriones *in vitro*. Este mismo autor, detectó la presencia de la bacteria en el 27% de las muestras de fluido folicular e identificó nueve cepas de *L. interrogans* pertenecientes al grupo Sejroe; y destacó además que el 65% de las explotaciones tuvieron al menos una vaca positiva a *Leptospira* en el rebaño, por lo que las consecuencias productivas y económicas a nivel de hato pueden ser realmente preocupantes.

Respecto a lo antes señalado, es importante recordar que el serovar Hardjo-Prajitno, tiene predilección por el tracto genital, y es una causa de infertilidad, por tanto, la presencia de *Leptospira* en el útero y los oviductos de vacas infectadas impide la implantación del embrión u otros elementos de la preñez (Grooms, 2006).

Por su parte, Dos-Santos et al. (2022) evaluaron la presencia de *Leptospira* spp. en el líquido folicular de 251 vacas mestizas pluríparas provenientes de diferentes hatos lecheros comerciales de grado de tecnificación medio a alto y sin signos clínicos aparentes de leptospirosis, habiéndose encontrado que 66 (26,7%) fueron positivas para *lipL32*-PCR lo que confirmó la presencia de ADN de *Leptospira* en líquido folicular en vacas, estos hallazgos revelan una alta incidencia de infección en el ovario de vacas asintomáticas, destacando la importancia de considerar el síndrome de leptospirosis silenciosa al evaluar animales para biotécnicas de reproducción asistida.

Los hallazgos de esta investigación, como aquellos que se han citado anteriormente toman relevancia en lo señalado por Mosquera-Escobar et al. (2022) quienes en su estudio experimental inocularon a 21 ratas Wistar una concentración bacteriana de 300 millones de *leptospiras* por ml por vía intraperitoneal al cuarto día de gestación, encontrando algunas alteraciones histopatológicas como quistes (36,11 %) y microhemorragias ovárica (33,33 %), congestión vascular en trompas uterinas (66,67 %) y útero (80,56 %), así como endometritis y la hemorragia uterina en más del 50 % de los animales. Estos resultados insisten una vez más en el daño causado por *Leptospira* a nivel reproductivo.

Por otro lado, Pérez-Gil (2023) seleccionaron 25 hembras búfalas de 4 granjas con un bajo rendimiento reproductivo para ser llevadas a matadero y recoger muestras de útero, oviductos, ovarios y riñones; las muestras se cultivaron en medios selectivos para *Leptospira* y se prepararon muestras de tejido para análisis histológico y PCR en nueve muestras de cultivo para la detección de *Leptospira*. El cultivo de tejido fue positivo para *Leptospira* spp. en útero (76%), ovario (84%), oviducto (88%) y riñón (96%); asimismo, mediante la prueba

PCR utilizando el marcador G1-G2 (son indicadores descritos por Gravekamp et al. 1993. dirigidos a una secuencia específica del gen *secY*) se reveló la presencia ADN de *Leptospira* en el 55,5% de las muestras de útero, ovario y oviducto, y en el 44,4% de los riñones; y se identificaron leptospiras patógenas en el 55,5% de las muestras de útero y riñón, el 33,3% en ovarios y el 66,6% en oviducto.

Lo antes señalado no es coincidente con los resultados de este estudio en lo que respecta a identificación de la bacteria en útero, ya que el resultado de las muestras de lavado uterino fueron negativos a la presencia de *Leptospira* spp; estos resultados negativos pueden atribuirse a concentraciones de ADN por debajo del umbral detectable (Latosinski, GS; 2018). Respecto a la colonización uterina por parte de la espiroqueta Freile, D. (2015)., en su investigación descubrió una correlación entre los casos de metritis identificados y la presencia del patógeno al que se puede atribuir esta alteración reproductiva; sin embargo, las metritis identificadas en este estudio también podrían ser causadas por un sinnúmero de agentes infecciosos que deberían ser investigados.

Otras investigaciones han reportado el hallazgo de la bacteria en genitales como la vagina, así por ejemplo, Bruno Cabral Pires (2018) demostró en Rio de Janeiro (Brasil) la presencia de ADN de *Leptospira* en vacas no preñadas (20,6%), lo que es relevante ya que el fluido vaginal representa adecuadamente el ambiente uterino; sin embargo hay quienes cuestionan este tipo de hallazgos ya que postulan una contaminación de la muestra de fluido vaginal con orina si no se usa una correcta técnica de muestreo.

En un estudio realizado por Selcarajah, et al. (2021) detectó que las muertes de los fetos son comunes por leptospirosis, al igual que el aborto espontáneo. En la investigación realizada por Follmer (2017), se recolectó información de 319 fetos, los cuales fueron estudiados a través de necropsia, histopatología, bacteriología, inmunofluorescencia directa y serología, 13 fetos resultaron positivos a leptospirosis, lo cual demuestra que los fetos también son infectados.

Para finalizar, es necesario hacer énfasis que los resultados presentados en la investigación deben ser considerados como una aproximación o acercamiento a la detección y frecuencia de la presencia de *Leptospira* spp. en el tracto reproductor de hembras bovinas faenadas; por lo cual, se sugiere que futuras investigaciones repliquen el estudio, incrementando el número de animales muestreados y de órganos evaluados y se consideren métodos de detección de lesiones tisulares asociados con la presencia de la bacteria, con la finalidad de lograr una mejor comprensión del efecto de la infección natural por *Leptospira* sobre el tracto reproductor de las hembras bovinas.

8. Conclusiones

- La presencia de *Leptospira* spp. en el tracto reproductor de las hembras bovinas fue identificada en el 8 % de las 50 muestras obtenidas por aspirado folicular y no existió presencia de la bacteria en las 50 muestras del lavado uterino mediante la prueba PCR convencional (*hap1*), lo que se traduce en consecuencias negativas sobre el desempeño reproductivo de los animales
- En ninguna de las muestras obtenidas del útero de los animales se encontró la presencia de *Leptospira* patógena; sin embargo, las lesiones evidentes de metritis en los órganos inspeccionados sugieren la participación de otros agentes infecciosos que deben seguir siendo investigados
- La detección de *Leptospira* spp., en hembras bovinas faenadas recuerda que la leptospirosis sigue siendo una enfermedad reproductiva importante en las ganaderías del cantón Loja y Zamora, además de representar un riesgo para la salud de las personas que trabajan en el manejo y cuidado de los animales y personal que labora en el camal.

9. Recomendaciones

- Realizar a futuro estudios que permitan explicar el daño tisular y conocer con mayor profundidad el efecto de las infecciones naturales por *Leptospira* patógena en la función reproductiva de los animales.
- Ampliar el estudio a otras parroquias y provincias del país, para nutrir la información epidemiológica de la enfermedad y poder establecer programas de prevención y control de la misma.
- Ofrecer los resultados obtenidos en esta investigación a instituciones de control como AGROCALIDAD y Ministerio de Salud Pública, para que establezcan planes de control y vigilancia tanto en animales como en personas relacionadas con el manejo de esta especie.
- Colaborar con personal médico acreditado en la vigilancia de la leptospirosis en los grupos de personas vulnerables como las que laboran en el centro de faenamiento.

10. Bibliografía

- Abdullah, M., Kadivella, M., Sharma, R., Baig, M., Faisal, S., & Azam, S. (2021). Comparative analysis of whole genome sequences of *Leptospira* spp. from RefSeq database provides interspecific divergence and repertoire of virulence factors. doi.org/10.1101/2021.01.12.426470.
- Adler, B. (Ed.). (2014). *Leptospira* and leptospirosis (Vol. 387). Springer.
- Alinaitwe, L., Kankya, C., Allan, K., Rodríguez-Campos, S., Torgenson, P., & Dreyfus, A. (2019). Bovine leptospirosis in abattoirs in Uganda: Molecular detection and risk of exposure among workers. *Zoonoses Public Health*, 66(6), 636-646.
- Ancha, P., & Szyfres, B. (2001). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Tercera Edición. *Publicación científica y técnica*, 580.
- 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.
- Arevalo, D. (2022). Detección de *Leptospira* patógena en hembras bovinas de edad reproductiva en la provincia de Morona Santiago. Universidad Nacional de Loja.
- Ariza, A., & Berdugo, C. (2017). Actualización de la leptospirosis bovina en Colombia. *Conexión Agropecuaria JDC*, 1, 57-77.
- Aymée, L., Gregg, W., Loureiro, A., Di Azevedo, M., Pedrosa, J., Melo, J., . . . Lilienbaum, W. (2021). Bovine Genital Leptospirosis and reproductive disorders of live subfertile cows under field conditions. *Veterinary Microbiology*, 261.
- Barragán, S. (2016). Serovares circulantes del género *Leptospira* entre bovinos del cantón Loja. *Universidad de Guayaquil*.
- Bautista, T., Bulla, C., López, B., Díaz, A., & Pulido, M. (2019). Leptospirosis: Enfermedad de importancia en salud pública. *Revista Colombiana de Ciencia Animal recia*, 11(2), 108-118. doi.org/10.24188/recia.v11.n2.2019.727.
- Bermúdez V. Importancia del control de *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo tipo hardjo bovis en el rebaño bovino. En: Desarrollo Sostenible De Ganadería Doble Propósito, p 270-280. 2008.
- Betancur-Hurtado, C., Orrego-Urbe, A., & González-Tous, M. (2013). Seroepidemiología de la leptospirosis En bovinos con Trastornos reproductivos en el municipio de Montería, Colombia. *Revista Médica Veterinaria*, 26, 47-55.
- Bielanski A., Surujballi O. Association of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type hardjo bovis with bovine ova and embryos produced by in vitro fertilization. *Theriogenology*, 46: 45-55. 1996.
- 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).

- Buen de Arguero, N. (2001). *Citología Diagnóstica veterinaria*. Manual Moderno.
- Buergelt, C., Clark, E., & Del Piero, F. (2017). *Bovine Pathology, A Text and Color Atlas*. CABI.
- Burgos, D., Bulnes, C., Pérez, M., Revelo, A., Falconí, M., Vera, L., . . . Fonseca, O. (2020). Asociación entre la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* y lesiones renales en bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(4), <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i4.19028>.
- Burgos, D., Pérez, M., Bulnes, C., Zambrano, M., Sandoval, H., Falconí, M., . . . Fonseca, O. (2018). Determinación de la seroprevalencia de *Leptospira* spp. y los principales serovares circulantes en el ganado bovino en la provincia de Manabí, Ecuador. *Revista científica y técnica*, 38(3), 1-17.
- Cabral, B. (2018). DETECÇÃO DE CARREADORES UTERINOS DE *Leptospira* spp. EM BOVINOS DESTINADOS AO ABATE NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. Tesis [Maestría en medicina Veterinaria, reproducción animal].
- Campos, N. (2014). Leptospirosis. Med. leg. Costa Rica vol.31 n.2
- Céspedes, M. (2005). Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Emergente. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 22(4).
- Chuquimarca, M. (2022). Relación entre factores de riesgos y la prevalencia de enfermedades zoonóticas en la zona 3 Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo y Pastaza. *Universidad Técnica de Cotopaxi*.
- Cornejo, D. (2018). Diagnosis of leptospirosis in bovine cattle and its typification, 19.
- Correia, L., Loureiro, A., & 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.
- Cosate, M., Sakamoto, T., Olivera, T., Moreira, É., Regis, C., Olivera, C., . . . Haddad, J. (2017). Molecular typing of *Leptospira interrogans* serovar *Hardjo* isolates from leptospirosis outbreaks in Brazilian livestock. *BMC Veterinary Research*, 13(177), doi.org/10.1186/s12917-017-1081-9.
- Costa, M, Ravara, A, Cota, M. (2006). Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *Journal of microbiological methods*, 65(2), 247-257
- 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. *Veterinaria Medica Interna*.
- 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*, <https://doi.org/10.1155/2021/6061685>.

- Di Azevedo, M., Cabral, B., Cardoso, L., Carvalho-Costa, F., & Lilenbaum, W. (2021). Characterization of leptospiral DNA in the follicular fluid of non-pregnant cows. *National Library of Medicine*, 188(9), DOI: 10.1002/vetr.143.
- Doménech, Ana & Gibello, Alicia & Collado, Víctor & Porras, Rebeca & Blanco Gutierrez, Maria. (2008). El Sistema Inmune Innato II: la primera respuesta frente a la infección. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 2008. 2.
- Dos-Santos, P., Nogueira, M., Dos-Santos, A., Loureiro, A., Martins, G., Carvalho-Costa, F., . . . Lilenbaum, W. (2022). Bovine genital leptospirosis: Evidence of ovarian infection by *Leptospira interrogans*. *Veterinary Microbiology*, 271, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109489>.
- Ellis, W. (2015). Animal Leptospirosis. Em *Leptospira and Leptospirosis, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Faine, S., Adler, B., Bolin, C., & Perolat, P. (1999). *Leptospira and Leptospirosis*. Medisci Press, Melbourne.
- 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.
- Fávero, J., Araújo, H., Lilenbaum, W., Machado, G., Tonin, A., Baldissera, M., . . . Da Silva, A. (2017). Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. *Microbial Pathogenesis*, 107, 149-154.
- Follmer, A. (2017). Estudio retrospectivo de leotospiriosis en fetos bovinos en la provincia de La Pampa. [*Trabajo de especialización, Universidad Nacional de la Planta-Facultad de Ciencias Veterinarias*].
- 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*.
- Freile León, D. (2015). Determinación e identificación de patógenos del tracto reproductivo mediante cultivo in vitro y serología en lavados uterinos y suero sanguíneo de vacas lecheras de la hacienda Irubí, Provincia de Pichincha (Tesis de pregrado). Universidad de las Américas, Quito.
- García, F. (2002). Tratamiento y control de la leptospirosis bovina. *Bovis*, 106, 77-95.
- Gasque, G. R. Enciclopedia Bovina. Enfermedades de los Bovinos. Leptospirosis. 2ª Ed. Universidad Nacional Autónoma de México. 168 p. 2008.
- Gayathri, R., Archana, V., & Ramya, M. (2022). Molecular Diagnostic Methods for the Detection of Leptospirosis. *J Pure Appl Microbiol*, 16(2), 782-795. <https://doi.org/10.22207/JPAM.16.2.24>.

- Góngora, A., Parra, J., & Sarmiento, L. (2022). Bovine leptospirosis: Effects on reproduction and an approach to research in Colombia. *Tropical Animal Health and Production*, 54(251).
- Gonzalez, F., & Rivera, S. (2015). Caracterización de la leptospirosis bovina en Venezuela. Revisión breve sobre la enfermedad. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 16 (2), 1-22.
- Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, Van Eys GJ, Everard CO, Hartskeerl RA, Terpstra WJ. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol*. 1993 Aug;139(8):1691-700. doi: 10.1099/00221287-139-8-1691. PMID: 8409911.
- Grooms D. L. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhoea virus and leptospirosis. *Theriogenology*, 66 (3) 624-628. 2006
- 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/10296/15109>.
- Hernández-Rodríguez, 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*, 73(1).
- Ibrahim, N., Alrashdi, B., Fathi, Y., Elmahallawy, E., Alblihed, M., Said, M., . . . Elbaz, E. (2022). Serological Investigation and Epidemiological Analysis of Bovine Leptospirosis in Egypt. *Tropical Medicine and infectious disease*, 24(9), DOI: 10.3390/tropicalmed7090208.
- Johnson, D. (2018). *Leptospira* spp. Bacterial Pathogens and Their Virulence Factors. *Springer, Cham*.
- Krieg, N., Staley, J., Brown, D., Hedlund, B., Paster, B., Ward, N., . . . Whitman, W. (2010). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer.
- Latosinski, GS; Fornazari, F.; Babboni, SD; Caffaro, K.; País, CA; Langoni, H. Detección serológica y molecular de *Leptospira* especies en perros. *Rev. Soc. Sujetadores. Medicina. Tropo*. 2018, 51, 364–367.
- 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.
- Llanco, L., Suárez, F., Huanca, W., & Rivera, H. (2017). frequency and risk of infection of bovine leptospirosis in two dairy farms of the coast and highlands of Peru. *Rev Inv Vet Perú*, 28(3), 696-702.

- Loor, & Muñoz. (2020). Lesiones renales en cerdos de matadero compatibles con leptospirosis porcina. [Titulo de grado, Universidad Técnica de Manabí].
- Loureiro, A., & Lilenbaum, W. (2020). Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. *Theriogenology*, 1(141), 41-47. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.09.011.
- Luna, S. (2019). Determinación serológica de títulos de anticuerpos contra *Leptospira interrogans* en cuyes (*Cavia porcellus*) con historial de abortos en crianza intensiva del distrito de Concepción, Junín. *Facultad de Ciencias Veterinarias y biológicas de la Universidad Científica del Sur*.
- Masmela, R., & Gutiérrez, C. (2021). Leptospirosis Bovina Enfocado en el Potencial Zoonótico, Alternativas de control y tratamiento. *Seminario de profundización sobre enfermedades infecciosas en Medicina veterinaria y zootecnia*.
- 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
- Monroy-Díaz, A., Vargas-Arias, J., Filippo-Iriarte, G., & Quimbaya-Ramírez, J. (2020). Leptospirosis en reservorios animales: Una revisión de tema. *Revista Lasallista de Investigación*, 17 (2), <https://doi.org/10.22507/rli.v17n2a23> .
- Mosquera-Escobar, M., Armas-Gonzalez, E., Alvares-Gonzalez, K., García-Otero, M., López-Alonso, M., & Pórras-Sparos, O. (2022). Daño diferenciado de las serovariedades de leptospirosis en los genitales internos en ratas Wistar gestadas. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*, 26(2).
- Muyulema, E. (2020). Estudio clínico epidemiológico de leptospirosis en hembras bovinas en edad reproductiva en el cantón El Pangui. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba.
- Nally, J., Hornsby, R., Alt, D., Bayles, D., Wilson, J., Palmquist, D., & Bauer, N. (2018). Isolation and characterization of pathogenic leptospires associated with cattle. *Veterinary Microbiology*, 218, 25-30.
- Nascimento, A., Ko, A., Martins, E., Monteiro, C., Ho, P., Haake, D., . . . Oliveira, M. (2004). Comparative Genomics of Two *Leptospira interrogans* Serovars Reveals Novel Insights into Physiology and Pathogenesis. *J Bacteriol.*, 186, 2164-2172.
- OEI. (2021). Capítulo 3.1.12. Leptospirosis. *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2021 (Vol. 1)*.
- OMS. (2008). Leptospirosis Humana: Guía para el Diagnóstico, Vigilancia y Control.
- OMSA. (2023). Leptospirosis. En *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los animales terrestres*, duodécima edición 2023. https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.12_Leptospir_osis.pdf.

- Orjuela, A., Parra-Arango, J., & Sarmiento-Rubiano, L. (2022). Bovine leptospirosis: Effects on reproduction and an approach to research in Colombia. *Tropical Animal Health and Production*, 54(5), 251.
- Ortiz, S., Duverne, L., López, O., Raffellini, S., & Mans, M. (2014). Efecto de cultivos lácticos sobre el desarrollo a bajas temperaturas de microorganismos causantes de ETA. *Revista de ciencia y tecnología*.
- Pérez-Gil, R. (2023). Reproductive problems in water buffalo cows associated with non-diagnosed genital leptospirosis: Preliminary results. *Revista Científica de la Facultad de Veterinaria*
- Pereira, Paulo (2023) Impacto de la presencia de *Leptospira* SPP. en el líquido folicular de las vacas sobre la competencia para desarrollar el ovocito. 2023. 86 y siguientes. Tesis (Maestría en Medicina Veterinaria) - Programa de Postgrado en Medicina Veterinaria - Clínica de Reproducción Animal. Universidad Federal Fluminense, Niterói, 2023.
- Picardeau, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 43, 1-9.
- Pinheiro, S., & Vasconcellos, S. (2009). Soroprevalência de leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado da Bahia.
- Pulido-Medellín, M., Díaz-Anaya, A., & Giraldo-Forero, J. (2017). Determinación de *Leptospira* spp. en humanos y bovinos pertenecientes al municipio de Toca, Boyacá. *Veterinaria y Zootecnia*, 11(2), 55-65.
- 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.
- Rivera, H. (2001). Causas frecuentes de aborto Bovino. *Rev. investig. vet. Perú* v.12 n.2.
- Rocha, B., Balaro, M., Pereira, P., Martínez, G., & Lilenbaum, W. (2018). Chronic experimental genital leptospirosis with autochthonous *Leptospira santarosai* strains of serogroup Sejroe. *Small Ruminant Research*, 164, 28-31.
- Rodríguez I. El Concepto Serovar en *Leptospira* (The concept serovar in *Leptospira*). *Revista Electrónica REDVET*, 12 (7): Art. 7. 2011
- 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.
- Romero, L., & Veloza, L. (2014). Leptospirosis bovina como causa de enfermedad reproductiva. *Revista Productora Agroecologica*, 5(2), 97-125.
- Romero-Vivas, C., & Falconar, A. (2016). *Leptospira* spp. and human leptospirosis. *Salud, Barranquilla*, 32(1).
- Sadow, K., & Ramírez, W. (2005). Leptospirosis. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 6(6), 1-61.

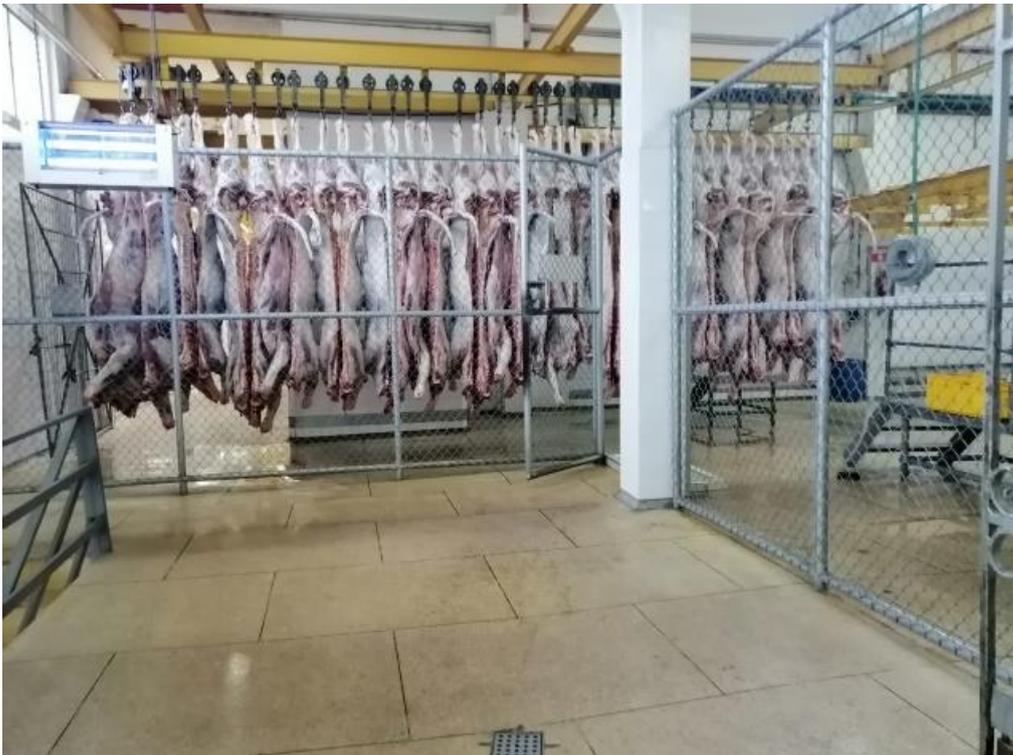
- Samrot, A., Sean, T., Bhavya, K., Sahithya, C., Chan-Drasekaran, S., Palanisamy, R., . . . Mok, P. (2021). Leptospiral Infection, Pathogenesis and Its Diagnosis—A Review. *Pathogens*, 10(2), 145.
- Schafbauer, T., Dreyfus, A., Hogan, B., Rakotozandrindrainy, R., Poppert, S., & Straubinger, R. (2019). Seroprevalence of *Leptospira* Infection in Cattle from Central and Northern Madagascar. *Int J Environ Res Public Health*, 16(11).
- Selcarajah, S., Corrió, S., Roberts, N., & Nair, M. (2021). Leptospirosis in pregnancy: A systematic review. *Plos Neglected Tropical*, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009747>.
- Sheen, S., & Riesco, A. (2002). Factores que afectan la producción de leche en vacas de docle propósito en el trópico húmedo (Pucallpa). *Revista de Investigación veterinaria de Perú*, 13(19).
- Sosa, A. (2015). Estudio Piloto: Detección de *Leptospira* en el cantón Portoviejo (Manabí). [Tesis de grado, Universidad San Francisco de Quito].
- 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. 215-222.
- Szwako, A., Acuña, L., Rolón, C., Glatzle, F., Lemkemeyer, C., U. N., & Wiebe, J. (2015). Seroprevalencia de leptospirosis bovina en el Chaco central, departamento de Boquerón Paraguay. *Compendio cienc. cet*, 5(1), 26-30.
- 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 lipI32 genes for human Leptospirosis in Thailand: A casecontrol study. *Plos One*, 6.
- Torres-Castro, M.; Hernández-Betancourt, S.; Agudelo-Flórez, P.; Arroyave-Sierra, E.; Zavala-Castro, J.; Puerto, F. I. (2017). Revisión actual de la epidemiología de la leptospirosis. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*; 54 (5)
- Valverde-Latorre, F., Ortega-Ramos, V., Yunga-Quimi, A., & Zamora-Rodríguez, A. (2021). Incidencia, prevalencia e identificación de factores de riesgo asociados a la infección por *leptospira*. *Dominio de las ciencias*, 7(4), 152-172.
- Vincent, A. S. (2019). Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(5).
- Villarreal, R., Ramos, E., Ramírez, R., Peláez, R., López, F., Agudelo, L., . . . Agudelo, P. (2019). Brotes emergentes de leptospirosis del Amazonas colombiano. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 71 (1).

Anexo 2. Imágenes de la toma de Muestras





Anexo 3. Certificación de traducción al idioma inglés.





Juan Pablo Ordóñez Salazar

**CELTA-Certified English Teacher,
traductor e intérprete.**

Certificación de traducción al idioma inglés.

JUAN PABLO ORDÓÑEZ SALAZAR.
CELTA-certified English teacher, traductor e intérprete.

CERTIFICA:

Que el documento aquí compuesto es fiel traducción del idioma español al idioma inglés, del resumen de tesis titulado: "Diagnóstico de leptospirosis genital en hembras bovinas faenadas en el cantón Loja", de autoría de la estudiante Martha Elizabeth Carrión Sarí, con número de cédula 1103707079, egresada de la Maestría Reproducción Animal Mención Rumiantes de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja.

Lo certifico en honor a la verdad, y autorizo a la interesada hacer uso del presente en lo que a sus intereses convenga.

Loja, 22 de febrero del 2024

Juan Pablo Ordóñez Salazar
DNI: 110360109-0
Código de Perito de la Judicatura: 12298374
Celular: +593 994290147
CELTA – CERTIFIED ENGLISH TEACHER, TRADUCTOR E INTÉRPRETE