

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

Pathogenic Leptospira detection in bovine females of reproductive age in Morona Santiago

Danilo Ismael Arévalo Torres^{1,*}, Víctor Montes- Zambrano² y Jhuliana Luna-Herrera¹

¹ Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, Universidad Nacional de Loja, Loja-Ecuador, diat0170@gmail.com, jhuliana.luna@unl.edu.ec

² Departamento de Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Técnica de Manabí, Manabí-Ecuador, victor.montes@utm.edu.ec

* Autor para correspondencia: diat0170@gmail.com

Fecha de recepción del manuscrito: 01/02/2024 Fecha de aceptación del manuscrito: 01/06/2024 Fecha de publicación: 30/06/2024

Resumen—La leptospirosis es una enfermedad zoonótica, causada por patógenos 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, el presente estudio buscó identificar la presencia del patógeno en hembras bovinas de edad reproductiva faenadas en el cantón Gualaquiza, 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 clave—Leptospirosis genital, *hap 1*, Enfermedad abortiva, MAT.

Abstract—Leptospirosis is a zoonotic disease caused by pathogenic species of the genus *Leptospira*. It is also a significant reproductive disease in cattle, leading to substantial economic losses due to abortions, infertility, decreased milk production, and animal mortality. Serological studies in Ecuador have revealed frequent circulation of serovars such as Pomona, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Canicola, Bataviae, Hardjo, Australis, and Sejroe. However, the limitations of serology necessitate the use of molecular techniques to accurately detect the pathogen and its colonization sites. In Morona Santiago province, there are no relevant studies on pathogenic *Leptospira* detection, therefore this study aimed to identify the presence of the pathogen in reproductive-age bovine females in the municipal feedlot of Gualaquiza canton through a cross-sectional observational study. Fifty female cattle were sampled for blood serum, urine, and uterine lavage to diagnose leptospirosis using microscopic agglutination (MAT) and conventional PCR (*hap 1* gene). Pathogenic *Leptospira* was detected in 8% of the animals. It is recommended that farmers and personnel implement necessary biosecurity measures to reduce transmission among animals and to humans.

Keywords—Genital leptospirosis, *hap 1*, Abortive disease, MAT.

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: fie-

bre, 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 ac-

cidentales 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 (Hardjoprajtino) 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 (Monroy *et al.*, 2020; Ramos, Cruz, *et al.*, 2019)

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 & Lilenbaum, 2020).

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.*, 2019). 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, Grippotyphosa (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, el presente estudio tuvo como objetivo detectar la presencia de *Leptospira* patógena en hembras bovinas de edad reproductiva del cantón Gualaquiza de la provincia de Morona Santiago, mediante PCR convencional (gen *hap 1*), y a la vez detectar anticuerpos anti *Leptospira* en los animales incluidos en el estudio

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de ejecución y período

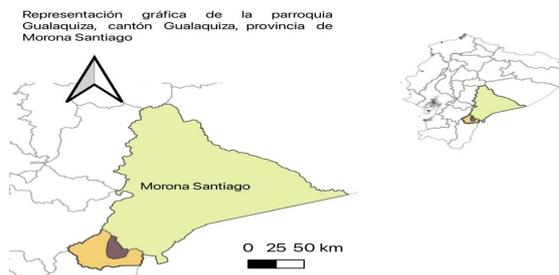


Fig. 1: Mapa de ubicación de la parroquia Gualaquiza, provincia de Morona Santiago

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.

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*).

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 hembras bovinas de edad reproductiva (sobre los 14 meses de edad) según el ingreso al matadero en el periodo de estudio considerado; estos criterios fueron considerados dada la naturaleza de la investigación, que discute el impacto de la infección por *Leptospira* sobre la salud reproductiva de los animales. El número de animales se determinó en función de la capacidad de faenamiento del matadero y el tiempo contemplado para la investigación.

Registro de información de campo

La información obtenida que se registró en cuanto a la edad, raza y estado reproductivo fue organizada en registros de campo, en los cuales, además, se asignó un código para la identificación de cada animal.

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 de reacción (Eppendorf). Para la colecta de la muestra del tracto reproductivo,

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. Las muestras fueron identificadas y transportadas en condiciones adecuadas a los laboratorios del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja

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, Wolffi y Hardjo.

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).

Detección de *Leptospira* spp. mediante PCR convencional

Las muestras de orina fueron sometidas a un proceso de estabilización y concentración (Stoddard, 2013). El protocolo de extracción consistió en utilizar 500 ul de buffer de lisis que contiene EDTA, SDS, TRIS, ClNa y 5 ul de proteinasa K sometidas a una incubación por una hora a 56°C, después de ese tiempo se aplicó etanol al 100% para provocar precipitación del ADN (Matamala Vera, 2024). 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 se utilizó un marcador de peso molecular de 50 pb.

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 >1:100. Todo el proceso serológico y molecular se llevó a cabo en el Laboratorio de *Leptospira* de la Universidad Técnica de Manabí.

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. El análisis se realizó en el software estadístico R versión 4.3.2.

RESULTADOS

Características de los animales estudiados

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

Resultados del diagnóstico mediante PCR convencional

Se detectó *Leptospira* mediante PCR convencional (*hap 1*) en cuatro animales. Dos de las 50 muestras de orina resultaron positivas confirmando la eliminación de la bacteria por esta vía; mientras que dos animales fueron positivos 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.

DISCUSIÓN

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; estos resultados contrastan con los reportados en la amazonía recientemente, específicamente en el cantón El Panguí, en donde se encontró una prevalencia del 12,21% (Muyulema Erazo, 2020), lo que podría atribuirse al diseño de este estudio, en el que no se consideró un muestreo aleatorio en la población de bovinos del cantón. Es importante señalar además 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; asimismo, 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 Panquí (a 25 km del cantón Gualaquiza) se encontraron animales positivos para el serovar *Australis*, por lo que habría que considerarlo para futuras investigaciones; 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.*, 2017); mientras que, en México, en un estudio de hembras bovinas en edad reproductiva, la unidad de producción presentó una frecuencia de 24,1 % (Ramos, Romero, *et al.*, 2019). Es probable que en estas investigaciones las seroprevalencias sean más elevadas por cuanto los animales seleccionados tenían antecedentes de problemas reproductivos.

Detección de *Leptospira* patógena

Leptospira spp. puede 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 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, la frecuencia de detección ha sido mayor en la provincia de Manabí, ya que en 72 muestras de orina se obtuvo 10 muestras positivas en PCR para detección del *gen rrl* (Revelo *et al.*, 2020).

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 leptospirosis 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.

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.

AGRADECIMIENTOS

Gratitud al personal técnico del centro de faenamiento del matadero municipal de Gualaquiza y a los académicos de la Universidad Nacional de Loja y de la Universidad Técnica de Manabí

REFERENCIAS

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., & Lilienbaum, W. (2021).

Bovine Genital Leptospirosis and reproductive disorders of live subfertile cows under field conditions. *Veterinary Microbiology*, 261. (link unavailable)

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). (link unavailable)

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. (link unavailable)

Branger, C., Blanchard, B., Fillonneau, C., Suard, I., Aviat, F., Chevallier, B., & André-Fontaine, G. (2005). Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. *FEMS Microbiology Letters*, 243(2), 437–445. (link unavailable)

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). (link unavailable)

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]. (link unavailable)

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>

Muyulema Erazo, E. H. (2020). Estudio clínico epidemiológico de leptospirosis en hembras bovinas en edad reproductiva en el cantón El Pangui [Tesis de Maestría]. Escuela Superior Politécnica del Chimborazo.

Figueredo, G., Ortiz, E., Guerrero, B., & Carrillo, A. (2017). Association between seropositivity to bvd virus, *leptospira interrogans* and neospora caninum and abortions in small holder farms in the dairy belt of Boyacá, Colombia. In *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru* (Vol. 28, Issue 4, pp. 1002–1009). Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

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.

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.

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.

Hamer, M., Saraullo, V., Brihuega, B., Watanave, O., Martínez, M., & Grune Loffler, S. (2019). 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.

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 Microbiología*, 52(3), 198–201.

Loureiro, A. P., & Lilenbaum, W. (2020). Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. In *Theriogenology* (Vol. 141, pp. 41–47). Elsevier Inc.

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).

Matamala Vera, S. A. (2024). Evaluación de la prueba MAT y PCR en sangre y orina para determinar el estatus de infección de vacas lecheras abortadas dentro de los siete días post aborto. Universidad Austral de Chile.

Monroy, Á., Vargas, J., Di Filippo, G., & Quimbaya, J. (2020). Leptospirosis en reservorios animales. *Revista Lallista de Investigacion*, 17(2), 267–279. <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.

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*.

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).

Pacheco, G. (2015). Una visión general de la leptospirosis *Artículo de Revisión* (Vol. 4, Issue 1).

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.

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).

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.

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.

Stoddard, R. A. (2013). Detection of Pathogenic *Leptospira* spp. Through Real-Time PCR (qPCR) Targeting the LipL32 Gene. *Detection of Microbial Pathogens*, 257–266.

Suárez, A., Cristina, Á., Parra, B., & Andrés, C. (2017). Actualización de la Leptospirosis bovina en Colombia. In *kmilo215@hotmail.com* (Vol. 7, Issue 1).

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].

Zeni, F. B. (2018). Estudio del comportamiento de pruebas diagnósticas serológicas, bacteriológicas y moleculares aplicadas en predios con sintomatología compatible con leptospirosis bovina.