

SEROPREVALENCIA A LEPTOSPIRA SPP., Y NEOSPORA CANINUM EN GANADERÍAS DEL CANTÓN LOJA.

Seroprevalence to *Leptospira* spp., And *Neospora caninum* in herds of the Loja canton.

¹Franklin Román-Cárdenas* , ¹Franco Cordero-Salazar , ¹Andrés Mora , ²Pablo Ramón

¹Universidad Estatal de Bolívar
²Universidad Técnica Particular de Loja

*franklinroman11@gmail.com

Resumen

Leptospirosis y neosporosis son enfermedades abortivas en el ganado bovino, la primera, una zoonosis producida por leptospiras, la segunda por un protozoario *Neospora caninum* enfermedad emergente en perros. Los objetivos fueron determinar la seroprevalencia de los bovinos a *Neospora caninum* y leptospira spp. Se utilizaron muestras de suero bovino, la determinación de anticuerpos a *Neospora caninum* mediante cELISA y de leptospira spp., por MAT, para la confirmación de ooquistes de *Neospora caninum* se realizó el examen coprológico Teleman, en el caso de seroreactores a leptospira spp., se obtuvo una segunda muestra, se analizaron 956 muestras de 158 UPAs, el 19.35 % resultaron seroprevalentes a *Neospora caninum*, a leptospira spp., una seroprevalencia del 74,83% , con títulos de 1/400 a la primera muestra del 28% y con títulos de 1/800 el 0.2%, la muestra pareada arrojó títulos de 1/400 en el 28% de las muestras, a las dos enfermedades una seroprevalencia de 19.17%, en los alrededores de la parroquia San Sebastián, existe mayor probabilidad de identificar leptospiras y en Jimbilla neosporas.

Palabras claves: *Neospora caninum*, *Leptospira* spp., Zoonosis, aborto.

Abstract

Leptospirosis and neosporosis are abortive diseases in cattle, the first, a zoonosis caused by leptospire, the second by a protozoan *Neospora caninum* emerging disease in dogs. The objectives were to determine the seroprevalence of cattle to *Neospora caninum* and leptospira spp. Bovine serum samples were used, the determination of antibodies to *Neospora caninum* by cELISA and of leptospira spp., by MAT, for the confirmation of oocysts of *Neospora caninum* the Teleman stool test was performed, in the case of seropositives to leptospira spp., a second sample was obtained, 956 samples from 158 UPAs were analyzed, 19.35% were seroprevalent to *Neospora caninum*, to leptospira spp., a seroprevalence of 74.83%, with titers of 1/400 to the first sample of 28% and with titers of 1/800 0.2%, the paired sample yielded titles of 1/400 in 28% of the samples, a seroprevalence of 19.17% for both diseases, in the surroundings of the San Sebastián parish, there is a greater probability of identifying leptospire and in Jimbilla neosporas.

Keywords: *Neospora caninum*, *Leptospira* spp., Zoonosis, abortion.

Fecha de recepción: 20-12-2022

Fecha de aceptación: 02-05-2022

Fecha de publicación: 01-08-2022

I. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es un trastorno infeccioso de animales y humanos. Es la infección zoonótica más común del mundo (1), descrita primariamente por Adolf Weil en 1886 (2), Stimson en 1907 preparo secciones del cerebro, hígado, cora-

zón y riñón, en los túbulos del riñón visualizo lo que denomino *Espiroqueta interrogans*, Después de 8 años en Japón fue encontrada por los investigadores Inada e Ido (3), nombrada como *Espiroqueta icterohemorragica*. El riesgo de infección del huésped luego de la interacción con fuentes ambientales depende de la capacidad de leptos-

pira para persistir, sobrevivir e infectar al nuevo huésped para continuar la cadena de transmisión. (4), afectando comúnmente a las poblaciones de escasos recursos y resultando en una morbilidad y mortalidad significativas (5), La leptospirosis a menudo se diagnostica erróneamente con otras enfermedades febriles tropicales.(6)

Leptospira interrogans es una de las principales causas de enfermedades humanas y *L. borgpetersenii* es una de las principales causas de enfermedades animales.(7), El período de incubación es de 2 a 30 días y la enfermedad generalmente ocurre de 5 a 14 días después de la exposición. (8). Las leptospirosis colonizan los túbulos proximales renales e infectan crónicamente el riñón. Las bacterias vivas se excretan en la orina, contaminando el medio ambiente (9). La forma más común de diagnosticar la leptospirosis es a través de pruebas serológicas, ya sea la prueba de aglutinación microscópica (MAT), que detecta anticuerpos específicos de serovar, o un ensayo de fase sólida para la detección de anticuerpos de inmunoglobulina M (IgM) (10).

Neospora caninum (*N. caninum*), un protozooario del filo apicomplexa, se distribuye globalmente e impone pérdidas económicas significativas a los productores y la industria ganadera (11). Los rumiantes se involucran principalmente como huéspedes intermediarios y los caninos como huéspedes definitivos (12) La seroprevalencia informada de exposición a *N. caninum* en el ganado oscila entre 7,6 y 41 % en las Américas (13, 14). La patogenicidad de *N. caninum* varía según su especie hospedera, el ganado es el huésped más susceptible, el parásito causa abortos, mortinatos, muertes neonatales, pérdida fetal temprana y reabsorción de embriones. (15,16).

Este parásito puede persistir en granjas y rebaños durante años, y la transmisión congénita, la principal vía de aborto provocada por *N. caninum*, juega un papel fundamental en este sentido.

Hoy en día, se dispone de varias técnicas de diagnóstico para la detección de la infección por *N. caninum*. En los casos de aborto por *Neospora* en bovinos, la histopatología y la inmunohistoquímica (IHC) utilizando tejidos de fetos aborta-

dos se consideran las pruebas definitivas (17) La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) también se utiliza para la determinación de ácidos nucleicos específicos de parásitos en muestras de animales abortados, como cerebros y placenta (18).

Todas las especies de mamíferos son potencialmente huéspedes accidentales de la leptospirosis y no se ha identificado ninguna especie como refractaria a la infección. Actualmente, existen más de 250 serovariedades conocidas de *Leptospira* spp., las cuales muestran una distribución variable por región geográfica y especie huésped (19). Los parásitos de *N. caninum* se han cultivado con éxito en líneas celulares humanas, pero se han informado títulos bajos de anticuerpos de especificidad no confirmada contra *N. caninum* en muestras de suero humano (20, 21,22). Seis de cada diez casos humanos de enfermedades infecciosas surgen de la transmisión animal (23) Los objetivos fueron: (i) determinar la seroprevalencia de los bovinos a *Neospora caninum* y *leptospira* spp.; (ii) determinar la seroprevalencia de los bovinos a los microorganismos, en el sector urbano y rural del cantón Loja.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio. El estudio en referencia se realizó en Unidades de Producción Agropecuarias UPAs (más de 500m²) de las parroquias Jimbilla, Chuquiribamba, Chantaco, Gualél, El Cisne, Vilcabamba, San Pedro de Vilcabamba, Malacatos, Quinara, San Sebastián, Sucre, El Sagrario, El Valle, pertenecientes a la zona urbana y rural del cantón Loja, que se encuentran entre los 1478 y 2880 msnm., presenta una precipitación por la variación de las isoyetas de 400 a 900 mm/año, la temperatura en base al trazo de las isoterms del cantón es de 10°C a 22°C.(23).

Se seleccionaron hembras bovinas comprendidas en edad reproductiva de más de un año de edad, en las que se han evidenciado o no abortos u otros problemas relativos a la reproducción, para el estudio no se consideraron machos de ninguna edad.

Se tomaron 956 muestras de sangre de 158 UPAs

áreas urbanas y rurales del cantón Loja, por punción de la arteria coccígea media, se recolectó en tubos vacutainers de 10 mL., tapa roja sin anticoagulante previamente rotulados, se transportaron en cooleres, sin ser expuestos directamente al hielo, en el laboratorio se registraron y codificaron en las matrices internas, el procesamiento se realizó mediante centrifugación a 3000 rpm., por el lapso de cinco minutos, el suero sanguíneo obtenido fue alicuotado en tubos Eppendorf de 0,5 mL., se conservaron a -20 °C., hasta el inicio de las pruebas, para el examen coproparasitario se tomaron 40 muestras de caninos de igual cantidad de ganaderías que resultaron seropositivas a *N. caninum*.

Ejecución de pruebas. La detección de la presencia de anticuerpos leptospirales se realizó a través de la prueba de Aglutinación Microscópica en Tubo (MAT) que utiliza diluciones seriadas del suero que se expone a igual volumen de suspensión de leptosiras vivas, se utilizaron serovariedades vivas de *Leptospira* spp., veinticuatro que se corresponde a patógenas y una de comportamiento saprofítico, para la interpretación de resultados se consideraron positivas las muestras que alcancen títulos iguales o superiores a 1 en 100 o más junto con signos clínicos, positivas si alcanza títulos superiores a 1 en 400 o cuando aumentan la titulación en la muestra pareada tomada entre los 14 y 21 días hasta cuatro o más veces sus títulos. Las pruebas se ejecutaron en los laboratorios del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI Quito y Guayaquil). Las biovariedades patógenas que se utilizaron fueron las clasificadas en *L. interrogans* y como control fue utilizada la biovariedad no patógena *L. patoc*.

La detección de anticuerpos a *Neospora caninum* se realizó mediante el kit de la casa VMRD Veterinary Medical research and development. 425 NW Albion Drive Pullman, WA 99163, (cELISA) considerando el protocolo del fabricante .

La detección de ooquistes en muestras de heces de perros utilizó el método rutinario para carnívoros de Teleman, en el cual se procesaron cerca de 5 g de heces por animal, se realizó flotación con solución de sacarosa, las muestras se examinaron con un microscopio óptico utilizando el

objetivo 400.

Análisis estadístico. La seroprevalencia y los intervalos al 95% de confianza se calcularon para las veinte y cinco biovariedades de *Leptospira*. Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado para analizar las asociaciones entre la seropositividad de *Leptospira* spp., *N. caninum* y las parroquias del cantón Loja, así como también para evaluar la relación entre los títulos de anticuerpos específicos y las diferentes serovariedades de *Leptospira*. Cuando las condiciones para aplicar la prueba Chi-cuadrado no fueron adecuadas, el valor p se aproximó a partir de simulaciones de Monte Carlo (18) con 10000 permutaciones. Las pruebas estadísticas se realizaron con el programa estadístico R versión 4.0.3 (19). Se aplicó regresión logística para desarrollar el modelo predictivo de la seropositividad de *Leptospiras* y *Neosporas* en función de las parroquias urbanas y rurales del cantón Loja. Para las parroquias que presentaron significación estadística ($p < 0.05$) se determinó la razón de probabilidad (Odds-ratio) con el respectivo intervalo de confianza. Para esto se utilizó la librería “oddsratio” del programa R.

III. RESULTADOS

Seroprevalencia a leptospirosis y neosporosis bovina en el Cantón Loja.

La prueba de MAT para las 956 muestras mostro una seroprevalencia a leptospirosis en el 74.83% de los casos, con títulos iguales o superiores a 1/100, la prueba de cELISA para la detección de anticuerpos anti *N. caninum* mostro una seroprevalencia del 19,35% ; la seroprevalencia para las dos enfermedades es del 19.17%.

Cantón	Muestras	Nro. de muestras seroreactivas	Nro. Muestras Anticuerpos para	Seroprevalencia	95% IC
	956	715	<i>Leptospira</i> spp.	74.83 %	71.4, 78.3
Hembras					
Loja	956	185	<i>Neospora caninum</i>	19.35 %	20.6, 27.4
mayores de un año	956	183	<i>Leptospira</i> spp., y <i>Neospora caninum</i>	19.17 %	16.0, 22.3

Tabla 1. Seroprevalencia a *Leptospira* spp., y *Neospora caninum* y a las dos enfermedades en ganado bovino del cantón Loja.

Los resultados nos muestran una mayor seroprevalencia de *Leptospira* spp., con relación a *Neos-*

pora caninum sin embargo, luego de evaluar la relación entre la seroprevalencia de *Leptospira* spp., y *Neospora caninum* y las diferentes parroquias del cantón Loja, no se evidenció relación significativa ($X\text{-squared} = 20.314$, $p = 0.9131$); es decir la proporción de seroprevalencia de leptospira y neospora se distribuye de forma similar en todas las parroquias.

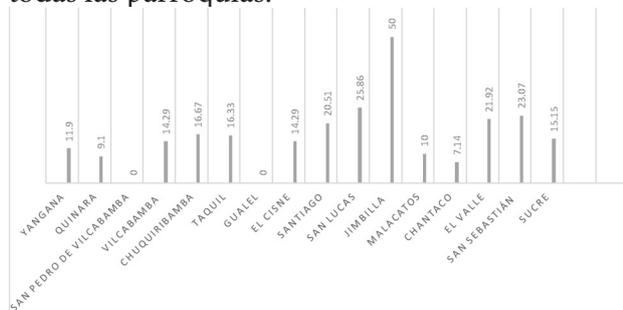


Figura 1. Seroprevalencia a *Leptospira* spp y *Neospora caninum*., en bovinos de parroquias urbanas y rurales del cantón Loja.

Al evaluar el riesgo de presencia de *Neosporas* y *Leptospiras* se encontró que las parroquias urbanas de San Sebastián y la rural de Jimbilla fueron significativamente diferente al resto de parroquias (Tabla 1).

Sitio	Estimador	OR	LI	LS	valor p
Positivas a MAT					
San Sebastián	1.897	6.67	1.75	24.11	0.0038
Positivas a ELISA					
Jimbilla	3.075	21.67	2.4	511.82	0.015
Positivas a MAT y ELISA					
Jimbilla	2.565	13	1.43	298.93	0.0411

Tabla 2. Factor de riesgo que afecta la seroprevalencia de *Leptospiras* y *Neosporas* en el cantón Loja, estimado mediante regresión logística. OR: odds-ratio, LI: límite inferior, LS: límite superior al 95%.

En la parroquia San Sebastián, la probabilidad de identificar *Leptospiras* en las muestras es 6.67 veces más que en el resto de parroquias, en Jimbilla el riesgo de encontrar *Neosporas* fue 21 veces mayor al resto de parroquias, y 13 veces mayor de encontrar simultáneamente *Leptospiras* y *Neosporas* (Tabla 2). El resto de lugares que no aparecen en la tabla presentaron estimadores de regresión no significativos.

Seroprevalencia por títulos obtenidos

Se obtuvieron 509 muestras con títulos de 1/100 (71.1%), 650 muestras con títulos de 1/200 (90.9%), 207 muestras con títulos de 1/400 (28.9%) y una muestra con títulos de 1/800 (0.2%), (Figura 2).

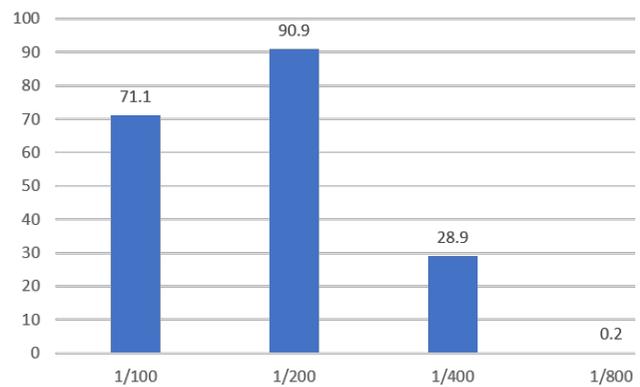


Figura 2. Niveles de titulación encontrados a *leptospira* spp. Muestra pareada

La muestra pareada utilizó del 7.4 % de los seroreactores, independientemente de la titulación mostrada (53 muestras) se obtuvieron títulos de 1/200 en el 54% de los casos (29 muestras); cuatro veces en el 28 % (15 muestras) y un 18 % no mostraron incremento de los títulos (9 muestras).

En todas las ganaderías lecheras visitadas se encontraron entre uno a diez perros al interior de la propiedad, al realizar la prueba coprológica de Telemán se determinó la presencia de oocistos en el 5% de las muestras.

IV. DISCUSIÓN

La leptospirosis tiene una amplia distribución, pero prevalece principalmente en las regiones tropicales y pobres del mundo (24), en la región tropical de la provincia de Manabí, los escasos estudios realizados denotan prevalencias variables, que van del 35.8% al 75% (25), Fuentes et al. (26) encontraron que los casos de leptospirosis en zonas endémicas de enfermedades tropicales con manifestaciones clínicas similares a la leptospirosis eran 26 a 49 veces mayores que los diagnosticados y reportados por los Servicios de Salud, en estudios realizados en zonas rurales del Ecuador se registró la positividad en orina de ganado del 35.4 % ($n = 17/48$), en la misma investigación se tomaron muestras de pacientes febriles sin diarrea o síntomas respiratorios agudos dando positivos para ADN de *leptospira* patógena en el 17,3 % ($n = 78/449$) (27). En el estudio se encontró una seroprevalencia en ganado bovino del 74.83%, no se pudieron registrar signos clínicos de la enfermedad en los animales sobre todo en las muestras con títulos de 1/100 y 1/200 por lo que se puede considerar que en algún momen-

to estuvieron en contacto con la bacteria o con la posibilidad de una enfermedad en curso, en cambio se registró una seroprevalencia al análisis de la primera muestra títulos de 1/400 del 28.9% y una muestra con títulos de 1/800 considerándose una infección activa. Siguiendo el protocolo se realizó la prueba a una segunda muestra en la que se determinó el incremento de los títulos 1/400 en el 28% de las muestras confirmando la infección activa, demostrando además que leptospira puede sobrevivir en un medio ambiente de temperatura inferior a lo que se reporta habitualmente.

La parroquia con mayor probabilidad de identificar Leptospiras es San Sebastián, posiblemente al manejo de los animales, ya que estas bacterias se transportan en la orina de animales infectados, como roedores, cerdos, vacas, perros y muchas especies de vida silvestre. Si la orina de un animal infectado se deposita o drena en un cuerpo de agua dulce (lago, río, arroyo, etc.) o suelo, la bacteria puede sobrevivir allí durante semanas o meses. (28)

En las últimas dos décadas, *N. caninum* ha sido ampliamente investigada debido a su importancia como patógeno veterinario. Como resultado de estos estudios, ahora se sabe que *N. caninum* tiene una distribución global y causa enfermedades neuromusculares graves en perros, y aborto y mortalidad neonatal en el ganado (29). En un estudio realizado en dos ganaderías de leche en Ecuador se encontró una alta seroprevalencia para *N. caninum* (21,5 %) (30), en nuestro estudio se encontró una seroprevalencia del 19,35%. Este patógeno protozoario se mantiene en el medio ambiente mediante un ciclo de vida heterogéneo que involucra un huésped cándido definitivo y una amplia gama de huéspedes intermedios (31), en todas las ganaderías investigadas se encontró perros en su interior que es el principal portador del parásito. Se cree que ocurren tres métodos naturales de transmisión de *N. caninum* en el ga-

nado: (32) ingestión de ooquistes esporulados del parásito (transmisión horizontal); (33) infección transplacentaria (transmisión vertical) de una madre previamente infectada a su descendencia (34); o (35) transmisión horizontal a una madre preñada seguida de transmisión vertical a su feto (transmisión horizontal y vertical combinada).

V. CONCLUSIONES

Los títulos de 1:100 o superior frente a uno o más antígenos leptospirales, sólo es evidencia indicativa de la enfermedad en un período anterior o posible enfermedad en curso.

Por los resultados de las muestras pareadas se considera confirmada la enfermedad de leptospirosis bovina cuando aumenta en cuatro o más veces el título de anticuerpos de los reactores investigados a los 14 a 21 días posteriores a la primera prueba en esta investigación se detecta una infección activa del 28%.

La presencia de perros en las ganaderías los convierte a los bovinos en hospedadores intermedios y contaminados por transmisión horizontal. La presencia de roedores cerca a los alimentos y fuentes de agua conjuntamente con la forma de crianza de los animales pueden estar incidiendo en los altos porcentajes de seropositividad a leptospirosis.

Mayor riesgo para que los bovinos desarrollen leptospirosis y *N. caninum*, es la parroquia Jimbilla y San Sebastián para leptospirosis. Estos resultados aportan con información para que las entidades competentes tomen medidas preventivas y se logre romper la cadena de infección.

VI. AGRADECIMIENTOS

A los ganaderos del cantón Loja, que a pesar de las condiciones continúan con su trabajo todos los días.

R eferencias

1. Wang S , Stobart Gallagher MA, Dunn N. Leptospirosis Madigan Army Medical Center. National Library of Medicine. 2021.
2. Pedraza A, Salamanca E, Ramírez R, Ospina J and Pulido M., Seroprevalencia de anticuerpos anti-Leptospira en trabajadores de plantas de sacrificio animal en Boyacá, Colombia Asociación Colombiana de Infectología 2012

3. García R, Reyes A, Basilio D, Ramírez M, and Rivas B. Leptospirosis un problema de Salud Publica Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Autónoma de México 2013.
4. Asmalia Md-Lasim , Farah Shafawati Mohd-Taib, Mardani Abdul-Halim, Ahmad Mohiddin Mohd-Ngesom, Sheila Nathan, Shukor Md-Nor. Leptospirosis and Coinfection: Should We Be Concerned? *Int J Res Public Heart Environ* 2021 Sep 6; 18(17):9411
5. Senaka Rajapakse. Leptospirosis: clinical aspects. *Clinical Medicine Journal* 2022 Vol 22, No 1: 14–7
6. Siti N Alia , Narcisse Joseph, Noraini Philip, Nurul N Azhari, Bashiru Garba, Siti N Masri, Zamberi Sekawi , Vasantha K Neela. Diagnostic accuracy of rapid diagnostic tests for the early detection of leptospirosis. *J Infect Public Health* Mar-Apr 2019;12(2):263-269
7. Camila Hamond , Karen LeCount Ellie J Putz, Darrell O Bayles, Patrick Camp, Marga G A Goris, Hans van der Linden, Nathan E Stone, Linda K Schlater, Jason W Sahl, David M Wagner, Jarlath E Nally Bovine Leptospirosis Due to Persistent Renal Carriage of *Leptospira borgpeterse* nii Serovar Tarassovi *Front Vet Sci* 2022 Apr 5;9:848664
8. Renee L. Galloway, Ilana J. Schafer, Robyn A. Stoddard Leptospirosis 'Travelers' Health Chapter 4(78)
9. Takayoshi Yamaguchi,^{1,4} Naomi Higa,¹ Nobuhiko Okura,² Arina Matsumoto,^{1,5} Idam Hermawan, ¹ Tetsu Yamashiro,¹ Toshihiko Suzuki,³ and Claudia Toma. Characterizing interactions of *Leptospira interrogans* with proximal renal tubule epithelial cells. *BMC Microbiol.* 2018; 18: 64. Published online 2018 Jul 4
10. Suman Veerappa Budihal and .Khalid Perwez. Leptospirosis Diagnosis: Competancy of Various Laboratory Tests *J Clin Diagn Res* 2014 Jan; 8(1): 199– Published online 2013 Jun 17.202
11. Reichel MP, Ayanegui-Alcérreca MA, Gondim LF, Ellis JT. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle—the billion dollar question. *Int J Parasitol.* (2013) 43:133–42. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.10.022
12. Dubey J, Barr B, Barta J, Bjerkås I, Björkman C, Blagburn B, et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int J Parasitol.* (2002) 32:929–46. doi: 10.1016/s0020-7519(02)00094-2
13. Cedeño QD, Benavides BB. Seroprevalence and risk factors associated to *Neospora caninum* in dairy cattle herds in the municipality of Pasto, Colombia. *Rev MVZ Córdoba.* (2013) 18:3311 10.21897/rmvz.193
14. Wilson DJ, Orsel K, Waddington J, Rajeev M, Sweeny AR, Joseph T, et al.. *Neospora caninum* is the leading cause of bovine fetal loss in British Columbia, Canada. *Vet Parasitol.* (2016) 218:46–51. 10.1016/j.vetpar.2016.01.006
15. Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev.* (2007) 20:323–67. 10.1128/CMR.00031-06
16. Dubey JP, Schares G. Neosporosis in animals—the last five years. *Vet Parasitol.* (2011) 180:90–108. 10.1016/j.vetpar.2011.05.031
17. Uzeda, R.S.; Schares, G.; Ortega-Mora, L.M.; Madruga, C.R.; Aguado-Martinez, A.; Corbellini, L.G.; Corbellini, L.G.; Driemeier, D.; Gondim, L.F. Combination of monoclonal antibodies improves immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 2013, 197, 477–486
18. Baszler T.V., Gay L.J., Long M.T., Mathison B.A. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. *J. Clin. Microbiol.* 1999;37:4059–4064. doi: 10.1128/JCM.37.12.4059-4064.1999.
19. Plank R, Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes Infect* 2000; 2:1265-1276
20. Dubey JP, Hemphill A, Calero-Bernal R, Schares G. *Neosporosis in animals*. Boca Raton (FL): CRC Press; 2017.

21. Lobato J, Silva DA, Mineo TW, Amaral JD, Segundo GR, Costa-Cruz JM, et al. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. *Clin Vaccine Immunol*. 2006;13:84–9
22. Robert-Gangneux F, Klein F. Serologic screening for *Neospora caninum*, France. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:987–9
23. Instituto Espacial Ecuatoriano Coordinación General del Sistema de Información Nacional MAGAP Generación de geoinformación para la gestión del territorio a nivel nacional escala 1:25.000 http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PDOT/ZONA7/NIVEL_DEL_PDOT_CANTONAL/LOJA/LOJA/IEE/MEMORIAS_TECNICAS/mt_loja_clima_hidrologia.pdf
24. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, et al. (2015) Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003898. pmid:26379143
25. Bulnes Goicochea CA, Zambrano Aguayo MD, Sandoval Valencia HP, Falconí Flores MA, et al. Determination of the seroprevalence of *Leptospira* spp. and the main serovars circulating in cattle in the province of Manabí, Ecuador. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* [Internet]. 2019;38(3):787–800. Available from: <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:umu:diva-166184>
26. Fontes RM, Cavalcanti LP, Oliveria AC, Bezerra LF, Gomes AM, Colares JK, et al.. A new possibility for surveillance: do we identify all cases of leptospirosis? *Rev Inst Med Trop São Paulo*. (2015) 57:443–6. 10.1590/S0036-46652015000500014
27. Barragan V, Chiriboga J, Miller E, Olivas S, Birdsell D, Hepp C, Hornstra H, Schupp JM, Morales M, Gonzalez M, Reyes S, de la Cruz C, Keim P, Hartskeerl R, Trueba G, Pearson T. High *Leptospira* Diversity in Animals and Humans Complicates the Search for Common Reservoirs of Human Disease in Rural Ecuador. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Sep 13;10(9):e0004990. doi: 10.1371/journal.pntd.0004990. PMID: 27622673; PMCID: PMC5021363.
28. Centers for Disease Control y Prevention Leptospirosis Risk in Outdoor Activities <https://www.cdc.gov/>
29. Dubey J.P., Schares G Neosporosis in animals—the last five years *Vet. Parasitol*, 180 (2011), pp. 90-108
30. Changoluisa D, Rivera-Olivero IA, Echeverria G, Garcia-Bereguain MA, de Waard JH; working group “Applied Microbiology” of the School of Biological Sciences and Engineering at Yachay Tech University. Serology for Neosporosis, Q fever and Brucellosis to assess the cause of abortion in two dairy cattle herds in Ecuador. *BMC Vet Res*. 2019 Jun 11;15(1):194. doi: 10.1186/s12917-019-1924-7. PMID: 31185969; PMCID: PMC6560894.
31. Donahoe SL, Lindsay SA, Krockenberger M, Phalen D, Šlapeta J. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2015 Apr 24;4(2):216-38. doi: 10.1016/j.ijppaw.2015.04.002. PMID: 25973393; PMCID: PMC4427759.
32. Hilali M, Lindberg R, Waller T, Wallin B. Enigmatic cyst-forming sporozoon in the spinal cord of a dog. *Acta Vet Scand*. (1986) 27:623–5. doi: 10.1186/BF03548142
33. Bjerkas I, Mohn SF, Presthus J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenkd*. (1984) 70:271–4. doi: 10.1007/BF00942230
34. Goodswen SJ, Kennedy PJ, Ellis JT. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. *Infect Genet Evol*. (2013) 13:133–50. doi: 10.1016/j.meegid.2012.08.012
35. Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc*. (1988) 192:1269–85.