



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Leptospira icterohemorrágica* EN
ROEDORES Y AGUAS RESIDUALES EN EL SECTOR SUR DEL CANTON
MACHALA**

**COBOS GUAICHA SELENA ESTEFANIA
MEDICA VETERINARIA**

**MACHALA
2024**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Leptospira*
icterohemorrágica EN ROEDORES Y AGUAS RESIDUALES EN EL
SECTOR SUR DEL CANTON MACHALA**

**COBOS GUAICHA SELENA ESTEFANIA
MEDICA VETERINARIA**

**MACHALA
2024**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

TRABAJOS EXPERIMENTALES

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Leptospira*
icterohemorrágica EN ROEDORES Y AGUAS RESIDUALES EN
EL SECTOR SUR DEL CANTON MACHALA**

**COBOS GUAICHA SELENA ESTEFANIA
MEDICA VETERINARIA**

AGUILAR GALVEZ FERNANDO LENIN

**MACHALA
2024**

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Leptospira* icterohemorrágica EN ROEDORES Y AGUAS RESIDUALES EN EL SECTOR SUR DEL CANTON MACHALA

por Selena Estefania Cobos Guaicha

Fecha de entrega: 12-ago-2024 01:28p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2431163261

Nombre del archivo: TESIS_FINAL_COBOS_SELENA_2024.docx (4.51M)

Total de palabras: 14097

Total de caracteres: 75798

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Leptospira* icterohemorrhagica EN ROEDORES Y AGUAS RESIDUALES EN EL SECTOR SUR DEL CANTON MACHALA

INFORME DE ORIGINALIDAD

9%

INDICE DE SIMILITUD

8%

FUENTES DE INTERNET

0%

PUBLICACIONES

3%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	dspace.unl.edu.ec Fuente de Internet	1%
2	www.slideshare.net Fuente de Internet	1%
3	scielo.sld.cu Fuente de Internet	1%
4	Submitted to BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA BIBLIOTECA Trabajo del estudiante	1%
5	www.dominiodelasciencias.com Fuente de Internet	1%
6	revistas.uta.edu.ec Fuente de Internet	<1%
7	Submitted to Ponce Health Sciences University Trabajo del estudiante	<1%
8	www.dspace.uce.edu.ec	

Fuente de Internet

<1 %

9

Submitted to Universidad Internacional del Ecuador

Trabajo del estudiante

<1 %

10

mefagram.sld.cu

Fuente de Internet

<1 %

11

repositorio.espam.edu.ec

Fuente de Internet

<1 %

12

ri.uaemex.mx

Fuente de Internet

<1 %

13

Submitted to Georgia Southern University

Trabajo del estudiante

<1 %

14

dbpedia.org

Fuente de Internet

<1 %

15

www.veterinaria.org

Fuente de Internet

<1 %

16

dspace.esPOCH.edu.ec

Fuente de Internet

<1 %

17

servicio.bc.uc.edu.ve

Fuente de Internet

<1 %

18

Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León

Trabajo del estudiante

<1 %

19 Submitted to Universidad Politecnica Salesiana del Ecuador <1 %
Trabajo del estudiante

20 doku.pub <1 %
Fuente de Internet

21 contenidos.usco.edu.co <1 %
Fuente de Internet

22 gacetamedicabilbao.eus <1 %
Fuente de Internet

23 repositorio.udh.edu.pe <1 %
Fuente de Internet

Excluir citas Activo

Excluir bibliografía Activo

Excluir coincidencias < 30 words

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

La que suscribe, COBOS GUAICHA SELENA ESTEFANIA, en calidad de autora del siguiente trabajo escrito titulado IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Leptospira icterohemorrágica* EN ROEDORES Y AGUAS RESIDUALES EN EL SECTOR SUR DEL CANTON MACHALA, otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

La autora declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

La autora como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.



COBOS GUAICHA SELENA ESTEFANIA

0705906980

UNIVERSITAS
MAGISTRORUM
ET SCHOLARIUM

DEDICATORIA

Dedico la presente investigación en primer lugar a Dios, por ser mi guía constante y fuente de fortaleza en cada paso de este camino. Su presencia ha sido una luz que me ha iluminado en los momentos más difíciles.

A mis padres, con todo mi amor y gratitud, por su inquebrantable apoyo, amor incondicional y por enseñarme el valor del esfuerzo y la dedicación. Sin su ejemplo y sacrificios, este logro no habría sido posible. Y a mi querida perrita Shaina, cuya compañía y alegría han llenado mis días de ternura y han sido un alivio en los momentos de estrés. Su lealtad y cariño me han recordado siempre la importancia de las pequeñas cosas que llenan el corazón

Selena Estefanía Cobos Guaicha

AGRADECIMIENTO

Principalmente quiero expresar mi mas profundo agradecimiento a mis padres Leoncio Cobos Zerda y Olivia Guaicha Obaco, cuyo apoyo incondicional ha sido fundamental en mi formación académica y personal por ser guías en mi camino, por sus cuidados, consejos, y amor. Del mismo modo, mi gratitud a la Universidad Técnica de Machala por brindarme un entorno de aprendizaje y crecimiento que me ha permitido desarrollarme tanto como profesional como personalmente. Agradezco a todos los profesores que fueron participes en este viaje, enriqueciendo mi experiencia académica. También deseo agradecer al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública por haberme abierto las puertas para el desarrollo de este proyecto, y por la oportunidad de contribuir a la investigación en este campo. Finalmente, no puedo dejar de mencionar al Dr. Alberto Orlando, por haberme brindado su apoyo, conocimiento, orientación y paciencia que fueron indispensables para la culminación de este4 trabajo.

A todos, mis más sinceros agradecimientos.

Selena Estefanía Cobos Guaicha

RESUMEN

Introducción: Esta enfermedad es causada por bacterias patógenas del género *Leptospira*, y puede ser fatal si no se trata de inmediato (1). Esta patología tiene una estimación de más de un millón de casos graves al año y una tasa de mortalidad del 5% al 20%. (2). A nivel mundial, la leptospirosis es una infección zoonótica endémica y reemergente con alta prevalencia.

Objetivo: Identificar la incidencia de leptospira icterohemorrágica. en roedores y aguas residuales mediante técnica de laboratorio PCR en el sector sur de la ciudad de Machala

Metodología: El presente trabajo, es un estudio de tipo transversal porque se lo ejecuto en un periodo corto de tiempo, procediendo con la toma de muestra se realiza en un tiempo determinado, para buscar la presencia o ausencia de *Leptospira*.

Resultados: Los resultados obtenidos fueron negativos, las muestras analizadas de roedores no mostraron presencia de *Leptospira*. Este hallazgo nos indica una baja prevalencia de la bacteria en la población de roedores en la zona investigada.

Conclusión: Se concluye que es probable que las condiciones secas experimentadas del ambiente de estudio durante la recolección de muestras hayan tenido un impacto significativo en la ausencia de la bacteria, por lo tanto aunque aún no se ha logrado el objetivo de crear un mapa epidemiológico para identificar la presencia de *Leptospira*, esta investigación proporciona información importante sobre la distribución actual de bacterias en el área y enfatiza la importancia de realizar investigaciones adicionales en una variedad de climas y períodos de tiempo.

Palabras claves: Leptospirosis icterohemorrágica, roedores, contaminación, estrategias de saneamiento

**"MOLECULAR IDENTIFICATION OF *Leptospira icterohemorrhagica* IN
RODENTS AND WASTEWATER IN THE SOUTHERN SECTOR OF MACHALA
CANTON"**

ABSTRACT

Introduction: This disease is caused by pathogenic bacteria of the genus *Leptospira*, and can be fatal if not treated immediately (1). This pathology has an estimate of more than one million severe cases per year and a mortality rate of 5% to 20%. (2). Worldwide, leptospirosis is an endemic and re-emerging zoonotic infection with high prevalence.

Objective: To identify the incidence of *leptospira icterohemorrhagica* in rodents and wastewater using PCR laboratory technique in the southern sector of the city of Machala

Methodology: This work is a cross-sectional study because it was carried out in a short period of time, proceeding with the taking of samples in a certain time, to look for the presence or absence of *Leptospira*.

Results: The results obtained were negative, the samples analyzed from rodents did not show the presence of *Leptospira*. This finding indicates a low prevalence of the bacteria in the rodent population in the investigated area.

Conclusion: It is concluded that the dry conditions experienced in the study environment during sample collection are likely to have had a significant impact on the absence of the bacteria, therefore although the goal of creating an epidemiological map to identify the presence of *Leptospira* has not yet been achieved, this research provides important information on the current distribution of bacteria in the area and emphasizes the importance of conducting further research in a variety of climates and time periods.

Keywords: Ichthyohaemorrhagic leptospirosis, rodents, contamination, sanitation strategies.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO I.....	10
I. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 PROBLEMÁTICA.....	12
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	13
1.3 Generalidades	14
1.3.1 Antecedentes de leptospira	14
1.3.2 Leptospira en la actualidad	14
1.4 Etiología.....	15
1.5 Reservorios.....	15
1.5.1 Roedores reservorio principal	15
1.5.2 Papel de Roedores en Transmisión de Leptospira.....	15
1.6 Resistencia del agente etiológico	16
1.6.1 Periodo de Incubación	16
1.7 Patogenia.....	16
1.8 Vías de transmisión	17
1.8.1 Transmisión directa	17
1.8.2 La transmisión indirecta.	17
1.8.3 Transmisión por medio de aguas residuales.....	18
1.9 Importancia de Leptospirosis en Salud Publica	18
1.9.1 Leptospira como mayor relevancia	19
1.9.2 Leptospirosis en América	19
1.9.3 MSP.....	19
1.9.4 Leptospirosis a nivel mundial	19
1.9.5 OMS	20
1.10 Epidemiología de la leptospirosis	20
1.10.1 Epidemiología de leptospirosis en poblaciones animales.....	20

1.10.2	Epidemiología de leptospira en poblaciones humanas en Ecuador	20
1.10.3	Epidemiología de leptospira en El Oro	21
1.10.4	Leptospirosis en otras especies	21
1.11	Manifestaciones clínicas de la enfermedad	22
1.11.1	En animales	22
1.11.2	En seres humanos	23
1.11.3	Triada de la enfermedad de Weil	23
1.11.4	Enfermedad De Weil	24
1.12	Diagnóstico	24
1.12.1	Herramientas Moleculares	24
1.12.2	Técnicas de Biología Molecular	25
1.12.3	Técnica de PCR En animales.....	25
1.12.4	Diagnóstico En humanos	25
1.13	Tratamiento	26
1.14	Prevención y Control.....	26
1.14.1	Medidas sobre el agente.....	26
1.14.2	Medidas sobre el huésped y vías de transmisión.....	26
1.14.3	Medidas sobre el huésped susceptible	26
1.15	OBJETIVO GENERAL	27
1.15.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
CAPÍTULO II.....		28
II. MATERIALES Y MÉTODOS		28
2.1	Tipo de Estudio	28
2.2	Paradigma.....	28
2.3	Ubicación del experimento	28
2.4	Población.....	29
2.5	Muestra.....	29

2.6	Variables	30
2.7	Materiales y reactivos	30
2.7.1	Equipos de protección personal	30
2.7.2	Materiales para realizar la necropsia.....	30
2.7.3	Materiales de recolección de muestras.....	31
2.7.4	Material de registro.....	31
2.7.5	Material para el descarte del roedor	31
2.8	Muestra de órganos	31
2.9	Procedimiento Previo A La Necropsia	31
2.9.1	Para el equipamiento del personal:	31
2.9.2	Para la limpieza del mesón:	32
2.9.3	Preparación del material a utilizar:	32
2.9.4	Para el sacrificio del animal:.....	32
2.9.5	Para la toma de muestra de sangre:	33
2.9.6	Para la disección del animal:	33
2.9.7	Para la toma de muestras de la cavidad torácica:	33
2.9.8	Para la toma de muestras de la cavidad abdominal:	34
2.9.9	Para el registro de datos del animal:	34
2.9.10	Para el almacenamiento de muestras colectadas	34
2.9.11	Para el descarte del animal:	34
2.10	Protocolo para extracción de ADN.....	35
2.10.1	Materiales Para Extracción de ADN	35
2.11	Procedimiento para la extracción de ADN	36
2.11.1	Extracción ADN Tejido - Riñón.....	36
2.11.2	Purificación de ADN genómico a partir de lisado mediante microcentrífuga.....	36
2.12	Extracción ADN - Sangre.....	37
2.12.1	Protocolo de células de mamífero y lisado sanguíneo.....	37

2.12.2	Protocolo de purificación.....	38
2.13	Extracción ADN - Aguas.....	39
2.14	PROCEDIMIENTO PARA LA PRUEBA qPCR.....	40
2.14.1	Preparación del Master Mix.....	41
CAPÍTULO III		43
III RESULTADOS		43
3.1	Discusión.....	55
CAPÍTULO IV		58
IV CONCLUSIONES		58
CAPÍTULO V		59
V. RECOMENDACIONES		59
BIBLIOGRAFÍA		60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de primers para identificación de <i>Leptospira</i> spp (2,3).....	40
Tabla 2. Reactivos para la preparación del Master Mix en las amplificaciones por qPCR para leptospira.....	42
Tabla 3. Programa del termociclador para las reacciones por PCR dirigidas a <i>Leptospira</i>	42
Tabla 4 Resultados obtenidos de prueba qPCR, en sangre de roedores.....	43
Tabla 5 Resultados obtenidos de prueba qPCR, en riñon de roedores.....	47
Tabla 6 Resultados obtenidos de prueba qPCR, en aguas residuales del sector sur...	49

CAPÍTULO I

I. INTRODUCCIÓN

La leptospira es una enfermedad zoonótica global, que ataca a más de 160 especies animales y a los seres humanos (3).

La leptospirosis es de amplia importancia médica y veterinaria por ende la distribución geográfica resultante de brotes estacionales que afectan a diversidad de animales (4) Esta enfermedad es causada por bacterias patógenas del género *Leptospira*, y puede ser fatal si no se trata de inmediato. Por tanto, se considera una enfermedad de baja mortalidad, pero de alta morbilidad (1)

Es la enfermedad con una estimación de más de un millón de casos graves al año y una tasa de mortalidad del 5% al 20%. (2)

A nivel mundial, la leptospirosis es una infección zoonótica endémica, prevalente y reemergente con alta prevalencia en regiones tropicales, subtropicales y templadas. Se considera un problema ya que afecta a la salud pública porque está aumentando a nivel mundial en todos los países desarrollados y en desarrollo. La incidencia anual se estima 4 a 100 por 100.000 habitantes, la tasa de mortalidad es de 5% a 30%, dependiendo de la zona afectada. Debido al diagnóstico deficiente y la presentación clínica inespecífica, su frecuencia puede no notificarse en áreas endémicas y confundirse con otras enfermedades endémicas (5).

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS 2012), debido a su relevancia en América Latina, la leptospira, brucelosis, encefalitis equina, al igual que la rabia y fiebre aftosa está sometida a vigilancia continua y su notificación es debidamente obligatoria.

El ministerio de salud de Ecuador estima que hay un caso por cada 100.000 personas por año en todo el país, con 547 casos reportados entre 2016 y 2020, principalmente en zonas costeras (6)

Diversos son los elementos ambientales, sociales y como también económicos que determinan la aparición de un brote de la enfermedad. Esto último suele ocurrir durante

periodos de inundación o fuertes lluvias. La urbanización desordenada junto con saneamiento escaso, acumulación de la basura y en efecto la proliferación de roedores crea el entorno perfecto para que esto suceda. Si además se les suma a los animales domésticos y de producción sin manejo sanitario, se agrava el problema de la salud pública. (4)

Recalcando que en Ecuador no hay un incentivo en las medidas de bioseguridad, peor aún en la ciudad de Machala ya que prácticamente el estado sanitario se encuentra en condiciones deplorables

Es por ello que con el presente proyecto se va a determinar si existe una alta incidencia de leptospira en la salud humana, la misma que se la puede encontrar en aguas residuales. Se trabajará con el fin de dar indicios de que la enfermedad está presente en la zona sur del cantón Machala, y no solamente se contribuirá a un análisis epidemiológico local de leptospira sino que también se podrá proporcionar información valiosa para el desarrollo de estrategias de control; permitiendo la adopción de medidas de bioseguridad en salud pública para reducir riesgos asociados a leptospira y sobre todo para el bienestar de la comunidad local.

1.1 PROBLEMÁTICA

La problemática principal que existe es la leptospirosis que tiene como reservorio principal a los roedores. La leptospira es una enfermedad infecciosa considerada de distribución mundial por ende transmitida a la mayoría de especies animales y al hombre. Considerando también que los roedores dejan sus excretas en aguas residuales lo cual genera que la bacteria se propague en animales. Así mismo esta enfermedad es relevante para la salud pública por ser una zoonosis

Al investigar este tema es de importancia ya que esta enfermedad es perjudicial, afectando no solamente a pequeñas especies, también a animales como a ganado bovino y granjas porcinas; ocasionando pérdidas a nivel de producción y económicas. En ocasiones no se presta la debida atención a la presencia de roedores, ya sea por la falta de información de la enfermedad, o por su difícil control.

1.2 JUSTIFICACIÓN

La leptospira es la enfermedad que está ampliamente distribuida en todo el mundo, afectando animales domésticos como también al hombre. Es de relevancia el estudio de la leptospirosis ya que la enfermedad es una de las más comunes en la actualidad y de gran relevancia en salud pública, cabe recalcar que su prevalencia exacta se desconoce, la infección se transmite a los humanos cuando entran en contacto con el agua contaminada por orina animal a través de los ojos, mucosas, o laceraciones en piel. Recalcando que las ratas son la principal fuente de infección a nivel global.

El presente trabajo está enfocado en la identificación molecular de leptospira tanto en roedores capturados, con en aguas residuales y de esa manera identificar la presencia de la enfermedad, ya que esta enfermedad afecta a personal de diferentes áreas sea médicos veterinarios, trabajadores de la industria pesquera, ganaderos, etc. Es de importancia analizar el riesgo por el cual están expuestos diferentes grupos de personas, y de esa manera tomar medidas de control y prevención.

Recalcando que es de consideración la leptospira por lo cual se debe conocer estado actual de esta enfermedad en el sector sur de Machala, y de esta manera que las personas se informen y tomen medidas de control; así como también que dicha información llegue a organismos públicos como Agrocalidad, ministerio de salud, para que intercedan en el problema principalmente eliminando al reservorio principal, realizando manejos adecuados de aguas residuales y de esta manera erradicando esta enfermedad infecto contagiosa.

1.3 Generalidades

A nivel mundial la leptospira tienen una gran importancia dentro de la salud pública ya que es una enfermedad infecciosa y se calcula que cada año ocurren más de un millón de casos y a causas de esta enfermedad son casi 60 mil muertes en todo el mundo. El surgimiento de la leptospira está influenciada por diferentes factores epidemiológicos tales como las condiciones de saneamiento, recurrentes inundaciones, patogenicidad y la dosis infecciosa de la leptospirosis y susceptibilidad del huésped (7).

Leptospira es una infección bacteriana que ocurre principalmente en regiones tropicales, pero también ocurre en climas templados, y afecta tanto a países industrializados como a países en desarrollo (2).

1.3.1 Antecedentes de leptospira

La leptospirosis tiene diferentes nombres: enfermedad de Weil, enfermedad de los porcinos, fiebre de los arrozales, fiebre de los cañaverales, etc. Existen relatos que describen síndromes muy similares a esta infección en civilizaciones antiguas: en la antigua Mesopotamia, mencionan síntomas patológicos sugestivos de leptospirosis; del antiguo Egipto (2500 a.C.) La misma conclusión se puede inferir del descubrimiento de papiros y evidencias que mencionan su presencia en Hipócrates y la Grecia de Galeno, y más tarde durante las Guerras Napolitanas. (8)

Durante la Primera Guerra Mundial, se produjo un brote de leptospirosis entre los soldados que luchaban en Europa. El primer caso de la enfermedad se informó en los Estados Unidos en 1922, luego en 1946, se había informado en 46 países. En Estados Unidos Wood, en 1947 aisló *Leptospira* de los excrementos de chinchillas americanas. Hay poca información disponible sobre la leptospirosis humana en México y los datos existentes, proviene en su gran mayoría, de cero estudios epidemiológicos. (8)

1.3.2 Leptospira en la actualidad

Actualmente se reconocen más de 260 serovares de *Leptospira spp.* Aunque pueden pertenecer a: *L. interrogans* o *L. biflexia*, la primera se considera como cepa patógena y la segunda una cepa de vida libre o no patógena. Los serotipos *Hardjo*, *Bratislava*, *Bataviae*, *Pomona*, *Icterohaemorrhagiae* y *canicola* se asocian comúnmente con infecciones en humanos y ganado y los dos últimos serotipos se aíslan frecuentemente en el perro (9)

1.4 Etiología

El agente causante de la enfermedad es una espiroqueta perteneciente a la familia Leptospiraceae, orden Spirochaetales, género *Leptospira*; es un microorganismo Gram negativo con una longitud de 6 a 20 μm y un diámetro de 0,1 y 0,2 (10).

1.5 Reservorios

La leptospirosis es causada por *Leptospira interrogans*. Animales salvajes y domésticos son considerados como reservorio de la enfermedad. Es fundamental tener presente que las serovariedades difieren según el animal infectado. Por ejemplo, las ratas transmiten la serovariedad *icterohaemorrhagiae*, los cerdos la serovariedad Pomona, el ganado bovino y caninos la serovariedad *canicola*; también mapaches la serovariedad *autumnalis*. Además, se han identificado otros huéspedes animales con periodos de portadores muy cortos entre los que se incluyen; ciervos, venados, zorros y ardillas (11).

Otras especies también pueden ocasionar la enfermedad, pero la más grave es la provocada por *Leptospira icterohaemorrhagiae* (12)

1.5.1 Roedores reservorio principal

Muchos patógenos transmitidos entre animales y humanos tienen a una variedad de especies de roedores como reservorios, incluidos los que más se destacan *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* y *Rattus rattus*. Dichas especies que habitan adentro como alrededor de las granjas, siendo fuentes naturales para diferentes agentes zoonóticos que son importantes para la salud y la producción animal (10).

Los portadores potenciales son los roedores que transmiten leptospira, particularmente en zonas cercanas a los ríos. Los altos niveles elevados de agua subterránea favorecen la retención de estas bacterias, lo que facilita la propagación de enfermedades y causan graves problemas económicos (13).

1.5.2 Papel de Roedores en Transmisión de Leptospira

Debido a que los roedores tienen una relación con leptospira, los microorganismos pueden sobrevivir y multiplicarse, y las bacterias pueden enviar a sus descendientes a través del recién nacido o placenta. La fuente más cercana de infección son los roedores del género *Rattus*, *Mus*, y *Apodemus*, dado que por medio de la orina contaminan: alimentos, agua y ambiente; afectando a la población humana y animal (14).

El género *Rattus* considerado el reservorio principal asintomático de leptospira y se han

utilizado como modelo experimental de resistencia a enfermedades porque no se han detectado cambios histopatológicos de relevancia, y las etapas de la leptospirosis conducen a una rápida propagación y acumulación del patógeno en los túbulos renales, por ende, la eliminación de microorganismos en tejidos distintos del riñón se da alrededor en nueve días post infección (10).

1.6 Resistencia del agente etiológico

La leptospirosis son unos microorganismos aeróbicos obligados, con una temperatura idónea de crecimiento entre 28 a 30°C. Son extremadamente sensibles a cambios de factores como: el pH del suelo, la intolerancia a la acidez, condición ambiental, ya sea temperatura o la humedad relativa. Todos estos microorganismos son muy vulnerables a la sequedad, al calor y al frío excesivo. En el frío pueden sobrevivir hasta 100 días a -20°C (14)

El pH adecuado para la proliferación de estas bacterias es 7,2 - 7,4, y valores de pH inferiores a 6 y superiores a 8 inhiben a este microorganismo. Por esta razón, es ácida la orina, las leptospiras que están presentes en ella mueren, lo que explica por qué la orina humana no puede transmitir la infección, pero la orina de rata, siempre que no esté diluida, no es significativo el problema, es decir no implica riesgo (14)

1.6.1 Periodo de Incubación

El periodo de incubación de la leptospira varía entre 2 a 30 días y puede presentarse con una amplia gama de manifestaciones clínicas, desde formas leves y asintomáticas hasta formas graves como la enfermedad de Weil (icterohemorrágica) (15). Por lo general se desarrolla en dos fases, la primera fase, que abarca del día 1 al 7 se conoce como la fase de leptospiremia o septicémica febril, durante la cual a menudo los síntomas son inespecíficos acompañados de fiebre superior a 39°C y también pueden detectarse en la sangre. La segunda fase llamada leptospúrica o inmune que comienza el octavo día y se extiende hasta la resolución de la enfermedad durante la cual se pueden precenciar anticuerpos en sangre y leptisporas en orina (16)

1.7 Patogenia

La leptospirosis es caracterizada como una enfermedad aguda y sistémica. Se cree que la fisiopatología de esta enfermedad implica diversos mecanismos interrelacionados que incluyen la alteraciones en endotelios de microcirculación, formando complejos inmunitarios, el efecto de toxinas, la falta de oxígeno en los tejidos y eventos hemorrágicos.

Tras la entrada de leptospirosis dentro del organismo, estas se dispersan por todos los tejidos y los órganos, incluyen fluido cefalorraquídeo y el líquido acuoso, lo que se conoce como: fase de leptospiremia. Entre los 5 y 7 días aparecen inmunoglobulinas dentro de la sangre y se descarta la leptospiras en la orina, lo que constituye la etapa inmune o de la leptospiuria. Posteriormente a la contaminación, se desarrolla una vasculitis sistémica, principalmente a nivel de los capilares, lo que causa extravasación en la sangre y anoxia relativa de los tejidos. Este proceso puede llevar a complicaciones como la hemorragia pulmonar, la nefritis intersticial y tubular, colestasis intrahepática, daño vascular en capilares hepáticos, inflamación meníngea y trombocitopenia, así como otras manifestaciones hemorrágicas derivadas a la vasculitis y la reducción de plaquetas (4).

1.8 Vías de transmisión

Un factor relevante es el método de transmisión. Debido a que leptospira es transmitida por varias especies de animales, principalmente roedores, la infección puede ser causada por colonización bacteriana en riñones y orina, contaminación ambiental e incluso algunas especies patógenas de leptospira, por lo que no presenta síntomas. Sobreviven después de pasar varias semanas en agua, suelen ser muy sensibles a la deshidratación y pH ácido. Puede transferirse por medio del contacto directo o indirecto por la orina de un portador, que contamina el agua, los alimentos y el suelo, e infecta a otros huéspedes a través de las mucosas, la piel y las heridas cutáneas, matando la bacteria (10).

1.8.1 Transmisión directa

La orina infectada es una fuente importante de infección en humanos, animales y vida silvestre. La transmisión generalmente ocurre a través de gotitas de orina o agua contaminada con orina, contacto directo con plantas o barro, membranas mucosas de los ojos, nariz, o boca, piel lesionada y a veces infectada, durante las relaciones sexuales y a través de la placenta, es decir de madre a feto (10).

1.8.2 La transmisión indirecta.

Otras rutas documentadas incluyen el contacto con secreciones de tejidos y/o sangre, la inhalación de aerosoles y la ingestión de alimentos insalubres, aunque la inhalación de aerosoles puede ser una fuente de contaminación accidental. La infección se transmite por la mordedura de un animal benigno (13).

Debido a que en la orina de humanos y carnívoros es ácida la leptospira no sobrevive mucho

tiempo. En la orina de ratas no representa una amenaza grave a menos que se diluya. La orina de vaca es considerada la mejor fuente de infección porque contiene un pH alcalino que beneficia la sobrevivencia de los microorganismos. Un mililitro de orina puede abarcar hasta 100 millones de microorganismos de leptospirosis. (17).

La leptospirosis humana también se puede contraer mediante exposición ocupacional, recreativa o de laboratorio. Por tanto, las ocupaciones es un factor de riesgo importante. Esto se debe a que ocurre comúnmente entre trabajadores que entran en contacto con animales, sus productos y/o subproductos, o trabajan en suelos húmedos y áreas semiinundadas (18).

1.8.3 Transmisión por medio de aguas residuales

La transmisión de leptospira por el agua es una de las vías de transmisión más importantes y recurrentes. Esto se debe a importantes brotes de leptospirosis por contaminación de fuentes de agua y casos relacionados con actividades recreativas. Aunque, no todos los tipos de agua son adecuados para la supervivencia de las bacterias, ya que factores como: salinidad, el pH, y la temperatura afectan a los microorganismos. A bajas temperaturas la reproducción del patógeno disminuye, pero aumenta la supervivencia. Por el contrario, la reproducción se ve favorecida a temperaturas más altas, pero el tiempo de supervivencia se acorta. Puede durar hasta 180 días y sigue siendo contagioso durante 22 días (13).

1.8.3.1 Aislamiento de leptospira en aguas residuales

Leptospira se aisló de muestras de agua recolectadas de ríos y arroyos. El análisis es muy importante porque estas fuentes de agua son utilizadas para el consumo de comunidades humanas y animales. *L. interrogans* tiene la capacidad de sobrevivir en aguas con concentraciones mínimas de nutrientes y muestran una similitud significativa con *L. biflexa* en lo que respecta a los genes involucrados en estos mecanismos de supervivencia y señalización. Aunque las especies saprofitas tienen una tasa de crecimiento acuático mayor que las especies patógenas, es importante determinar las especies dominantes, lo que no se puede lograr mediante cultivo sino mediante pruebas moleculares que puedan diferenciar cada especie o conocerse nuevas (13).

1.9 Importancia de Leptospirosis en Salud Publica

Se necesitan mejores sistemas de vigilancia y diagnóstico a nivel mundial, para determinar el verdadero impacto de la enfermedad. Esto reducirá la falta de notificación y, en consecuencia, identificará la distribución geográfica, la presencia de nuevos reservorios y, lo

más importante las verdaderas tasas de incidencia de la enfermedad. De igual manera, mejorando los sistemas de diagnóstico, las estrategias de intervención y control, es posible estimar y cuantificar los costos económicos de los trastornos y los costos del tratamiento de la alteración de la productividad y los parámetros reproductivos en humanos, individuos en edad reproductiva y animal (13).

1.9.1 Leptospira como mayor relevancia

Aunque, su importancia para la salud humana y las economías nacionales, la leptospirosis es una de las enfermedades zoonóticas menos diagnosticadas. Una explicación para esto puede basarse en la presentación clínica y las metodologías de diagnóstico disponibles. En cuanto a las manifestaciones clínicas la enfermedad presenta una alta gama de estas, tanto en humanos como en animales. Sin embargo, ninguna de ellas es característica y puede confundirse con otras enfermedades infecciosas. Para complicar aún más las cosas, existen formas asintomáticas de la enfermedad en diversas especies animales (19).

1.9.2 Leptospirosis en América

En Ecuador, el Ministerio de Salud reportó un total de 129 casos de leptospirosis humana a nivel nacional en 2010, con una tasa de incidencia acumulada de 0,91. En 2014 se registraron 351 casos. Se reportó la presencia de anticuerpos contra leptospira con una prevalencia del 16,85% mediante MAT en trabajadores involucrados en la producción animal en Loja - Ecuador, y con la misma técnica se identificaron las especies *L. bataviae swart*, *L. gripotyhosa*, *L. sejroe*, y *L. icterohemorrhagiae*, *L. castellanis*, *L. javanica*, y de *Leptospira biflexa*; *L. patoc* (17).

1.9.3 MSP

Según el informe de situación epidemiológica, el Ministerio de Salud Pública informó que hasta marzo 12 del 2023 se registraron 54 casos. En Ecuador, se estima que la leptospirosis ocurre en 1 persona por cada 100.000 personas cada año. En Machala, el primer caso de leptospirosis, una enfermedad bacteriana transmitida por la orina de animales contaminados, se reportó en abril de 2023, luego de que aparecieran varios casos en diferentes puntos del país durante el invierno (6).

1.9.4 Leptospirosis a nivel mundial

A nivel mundial, se informó que la prevalencia era del 10,7%, principalmente en América

del Norte (34/318), seguida por el sur de Asia (41/318) con el 12,9% y América latina y el caribe (114/318) aumento un 35,8%, en cuba la incidencia aumento al 42% y en Brasil la incidencia aumento a 45,6%. Estados unidos tuvo la incidencia más baja de leptospirosis con un 10,4%, India la más alta con un 11,9% y cuba la más alta con un 13,2% (20).

1.9.5 OMS

Hay que recalcar que el número de sucesos por leptospira han ido en aumento. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2017 en la cual notificaron más de 500.000 casos anualmente en todo el mundo. Se han informado brotes en Guyana, Nicaragua, Brasil y otros países de América Latina. La seroprevalencia es alta en algunos países latinoamericanos entre ellos Brasil 45%, Colombia 61%, México 10% y Venezuela 42%. Dado que esta situación es más común en Perú durante la temporada de lluvias, la seroprevalencia es muy baja, entre 2.6% y 1.3% (21).

1.10 Epidemiología de la leptospirosis

1.10.1 Epidemiología de leptospirosis en poblaciones animales

Estudios en áreas rurales del Ecuador han demostrado que también el ganado vacuno y porcino pueden ser el principal reservorio de transmisión de enfermedades a los humanos debido a la mayor prevalencia de especies patógenas de la clase leptospira (22).

La provincia de Manabí específicamente Portoviejo presenta temperaturas cálidas, húmedas y las especies involucradas en su propagación (porcinos, bovinos, caninos y humanos). Por la falta de limpieza en los lugares donde se mantienen los animales (granjas y corrales) infieren tanto la posibilidad de circulación de patógenos como los factores de riesgo que favorecen el desarrollo de enfermedades (23).

1.10.2 Epidemiología de leptospira en poblaciones humanas en Ecuador

La primera evidencia de leptospirosis en humanos en Ecuador apareció en 1918 por Hideyo Noguchi cuando aisló *Leptospira spp.* Estos siendo diagnosticados como fiebre amarilla. Un año después, Noguchi aisló *L. icterohaemorrhagiae* de ratas y posteriormente *L. icteroides* y *L. icterohaemorrhagiae* se han aislado de ratones en Guayaquil y otras regiones (24).

El primer caso humano confirmado bacteriológicamente de *L. icterohaemorrhagiae* en Ecuador se notificó en 1924, a pesar que dicha especie había sido aislada de roedores en 1919 en la ciudad de Guayaquil. La Organización Panamericana de la Salud (OPS) estima que existen 10.702 casos de leptospirosis cada año en la región, de los cuales el 7,2% ocurre en

Ecuador, el cuarto país más común; después de Brasil, Perú, y Colombia. Internacionalmente, Ecuador ocupa el puesto 18, con 11,6 casos anuales de leptospirosis por millón de habitantes (3).

El peor brote registrado ocurrió en la ciudad tropical de Guayaquil en 1998, donde el 80% de los casos fueron de hospitalización y el 12% fueron de mortalidad. Pese a la endemidad de leptospirosis en el Ecuador, no existen documentos oficiales que consideren la distribución geográfica de la enfermedad, el reservorio y tipos de especies de *Leptospira spp* (6)

1.10.3 Epidemiología de leptospira en El Oro

Del 2016 al 2020 se presentaron 14 casos acumulados de leptospirosis en 24 provincias, siendo las tasas más altas Zamora Chinchipe con 29.69%, Manabí con 15.65%, seguida de Cotopaxi y Esmeraldas con 9.38%. Entre las regiones con menor incidencia de casos (1,56%), se encontró un caso cada una en Santa Elena, El Oro, Los Ríos y Morona Santiago. El desglose de los casos por sexo y edad, muestra que el 55% de los más afectados son hombres, con edades comprendidas entre 20 y 49 años. Esto indica la edad productiva de la persona infectada. De 2016 a 2020, los grupos de mujeres sufrieron el 45% de los daños (25).

1.10.4 Leptospirosis en otras especies

En Ecuador, el cuy es una fuente crucial de alimento y sustento económico para la población indígena. Se utilizan tres métodos de crianza para producir esta especie, y un estudio encontró pruebas de infección por *Leptospira spp*. Este es el primer informe en el país sobre la presencia de MAT Y PCR convencional en el 6,86% de los cuyes estudiados para la producción animal. El 6,86% de infección muestra la vulnerabilidad de esta especie ante la *leptospira spp*. En zonas de producción para el consumo humano, junto con la identificación de los serovares. (26)

El 48% de los mapaches en el centro-oeste de Illinois dieron positivo para seropositividad, incluyendo 220 mapaches con anticuerpos para *L. interrogans* serovar Grippotyphosa y dos para *L. canicola* e *icterohemorrhagiae*. Niveles de anticuerpos de tortugas de Blanding (*Emydoidea blandingii*) en entorno urbano en el noreste de Illinois mostraron anticuerpos por exposición a *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa y *L. interrogans* serovar Bratislava e *icterohemorrhagiae* (27)

Las zarigüeyas tienen anticuerpos contra uno de los siete serovares de leptospira, siendo *autumnalis* el serovar más común (38,7%), seguido de Bratislava (28,5%) y *grippotyphosa*

(21,3%) (28)

Los cerdos salvajes (jabalís) han aumentado su presencia en el territorio estadounidense en los últimos años, reportándose en al menos 39 estados de los 50. Es crucial entender la posibilidad de contagio por serovares transmitidos por cerdos salvajes. Se recolectaron riñones de cerdos salvajes y se emparejo suero de 677 cerdos salvajes en 124 condados de 29 estados para estudiar la probabilidad de liberación de leptospiras infecciosas. Previamente se identificó que estos condados son positivos para los serovares de *Leptospira interrogans bratislava*, *canicola*, *grippityphosa*, *hardjo*, *icterohemorrhagiae* y *pomona* (29).

Esta investigación se incluyeron cuarenta y seis Boas constrictor silvestre rescatadas de las áreas periurbanas de la Bahía del noreste de Brasil en 2018 donde se utilizaron ensayos moleculares y verificando la serorreactividad a través de pruebas como MAT, además de poder identificar los serogrupos más frecuentes. De las muestras analizadas 46 de 7(15,21%) resultaron positivas por PCR y fueron confirmados como leptospira interrogans por medio de la secuencia del gen sec Y, utilizando la prueba MAT 46 de 37(80.43%) se consideraron reactivas y el grupo más frecuente es el de Panamá (30).

En un estudio retrospectivo del 2014 al 2017 en Santa Fe – Argentina se recolectaron muestras de sangre durante los meses de diciembre, enero y febrero meses en los cuales son más activos para aquellos animales, de 25 individuos en cautiverio y 20 en estado silvestres, la presencia de anticuerpos fue determinada mediante prueba MAT y PCR para la detección ADN bacteriano. Fueron excluidas 9/45 muestras analizadas mediante la prueba de MAT porque cinco contenían suero lipémico y cuatro estaban contaminadas debido a otros organismos. De los 36 caimanes evaluados por MAT, el 56% (20/36) fueron clasificados como reactivos, 36 muestras analizadas, 20 fueron positivas 35%, (6/17) de silvestres y 74% (14/19) de animales cautivos, se detectaron anticuerpos contra leptospiras por MAT. El serogrupo con mayor predominancia fue Pyrogenes con el 85% (n = 17/20), con coaglutinaciones observadas con Icterohaemorrhagiae en el 25%, (n = 5/20) de los casos (31)

1.11 Manifestaciones clínicas de la enfermedad

1.11.1 En animales

A pesar que existen muchos serotipos patógenos, solo dos se consideran los más importantes en perros. El serotipo *canicola*, se asocia con nefritis intersticial aguda y el serotipo

icterohaemorrhagiae que afecta al hígado y provoca hemorragia e ictericia (32).

Los signos clínicos de la leptospirosis son muy similares en todas las especies animales excepto en *L. interrogans*, serovar *L. Icterohaemorrhagiae* que causan septicemia de gravedad y algunos serotipos causan hemolisis. La anemia hace que la frecuencia cardíaca aumente. Sobre todo, algunas especies infectadas desarrollan infecciones renales que son persistentes. Las infecciones en caballos provocan uveítis recurrente. Se han identificado cuatro síndromes en perros: ictericia, hemorragia, enfermedad de Stuttgart, y síndrome reproductivo (33).

1.11.2 En seres humanos

Los seres humanos suelen ser huéspedes accidentales y pueden infectarse a través de cortes, abrasiones, membranas mucosas, conjuntiva o ingestión de agua contaminada. Las manifestaciones clínicas de la leptospirosis pueden variar desde síntomas leves inespecíficos hasta resultados fatales, que incluyen insuficiencia hepática y renal, hemorragia pulmonar, meningitis y shock séptico (34).

Enfermedad de Weil; Conocida como la forma grave de la enfermedad, también conocida como fiebre hemorrágica causada por *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*. La enfermedad de Weil tiene el peor pronóstico y los síntomas más graves. Esto puede ocurrir en el primer curso de la enfermedad o en la segunda etapa del curso (alrededor del día 13, luego de 3 días de remisión o después del inicio tardío del tratamiento). Los órganos que comúnmente afectados son: riñones, hígado, y los pulmones (35).

1.11.3 Triada de la enfermedad de Weil

El cuadro clínico típico consta de tres síntomas: hemorragia, ictericia y enfermedad renal aguda. Los pacientes a menudo desarrollan sepsis debido a la falla multiorgánica y complicaciones hemorrágicas graves, afectando los pulmones (hemorragia pulmonar), tracto gastro intestinal (melena, hemorragia), sistema genitourinario (hematuria) y la piel (petequias, equimosis y sangrado en el sitio de la punción venosa). La nefropatía aguda es común, ocurre unos días después del inicio de la enfermedad y puede ser oligúrica o no oligúrica (35).

La afectación pulmonar ocurre en 20%-70% de los pacientes, y su gravedad varía desde tos seca hasta insuficiencia respiratoria debido principalmente a hemorragia pulmonar. Reconocer la enfermedad de Weil en pacientes que presentan síntomas pulmonares puede

resultar difícil (36).

1.11.4 Enfermedad De Weil

La enfermedad renal se manifiesta por proteinuria, piuria, hematuria y niveles elevados de nitrógeno ureico y creatinina en sangre. Los cambios típicos en el equilibrio electrolítico incluyen hipocalcemia e hiponatremia. La pérdida de magnesio en la orina es un fenómeno único en la enfermedad renal por leptospira. En casos especiales puede producirse síndrome urémico hemolítico. La ictericia ocurre en el 5% al 10% de todos los pacientes con leptospirosis. Aunque es intenso y puede dar a la piel un tono amarillo, no se asocia en lo absoluto con una necrosis fulminante del hígado (37).

1.11.4.1 Tasa de mortalidad en humanos a causa de leptospira

La mayor tasa de mortalidad se presenta en personas mayores de 40 años, asociada a cambios en el estado mental, insuficiencia renal aguda, insuficiencia respiratoria, hipotensión y arritmias cardíacas. Los síntomas a largo plazo luego de una leptospirosis grave incluyen; fatiga, dolor muscular, debilidad y dolores de cabeza y pueden durar años (38).

Por lo general, la enfermedad ocurre en el 90% - 95% de los casos en forma leve, y de manera grave el 5% - 10%. Aproximadamente un tercio de los pacientes infectados experimentan complicaciones de la enfermedad, que pueden incluso provocar la muerte. La tasa de mortalidad es del 15% al 25% y se asocia principalmente con insuficiencia renal. La asociación entre insuficiencia renal aguda y síndrome hemorrágico pulmonar puede aumentar la tasa de mortalidad de esta enfermedad en más del 50%. La tasa de mortalidad durante la ictericia es del 5% - 30%, con tasas de mortalidad más altas en pacientes mayores de 60 años (39).

1.12 Diagnóstico

Los métodos de diagnóstico de la leptospira se dividen principalmente en dos tipos: existen métodos de detección directa de bacterias o ADN, métodos que utilizan la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y métodos de detección de anticuerpos, entre los cuales la prueba de oro es la prueba de micro aglutinación (MAT), que es utilizado en la etapa aguda temprana de la enfermedad. Debe realizarse dentro de una semana de iniciar la prueba, y la elevación de títulos parece aumentar en la segunda muestra, el periodo de recuperación (40).

1.12.1 Herramientas Moleculares

La PCR es particularmente eficaz cuando se realiza en sangre y orina en las primeras etapas

de la enfermedad, desde el día 1 al día 7. Por lo general esta enfermedad requiere instalaciones especiales de registro y análisis para gestionar mejor los casos, prevenir eventos fatales y predecir epidemias (40).

1.12.2 Técnicas de Biología Molecular

El desarrollo de métodos de biología molecular juega un rol importante en el diagnóstico temprano de leptospirosis teniendo como objetivo la detección directa de secuencias blanco de ADN de la leptospirosis. Los métodos basados en ADN tales como *Dot blot* o *Southern blot* o la reacción de cadena de la polimerasa (PCR), que utilizan secuencias específicas como sondas, son útiles para identificar especies de leptospira patógenas y no patógenas y para diagnosticar infecciones agudas (41).

1.12.3 Técnica de PCR En animales

La necesidad de un diagnóstico directo y rápido ha llevado al desarrollo de muchas pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), cuya ventaja es que se pueden obtener diagnósticos específicos, sensibles y precisos desde la fase aguda de la enfermedad hasta la fase de convalecencia e incluso antes que los anticuerpos se puedan detectar con pruebas serológicas convencionales (13).

Estas pruebas se basan en la identificación de genes como *rrs*, *secY*, *lipL32*, *ligB2*, *liga* que amplifican pequeñas cantidades de ADN y pueden servir como marcadores moleculares de infección. Además, la selección de genes apropiados entre otras cosas, las pruebas de laboratorio dependen de la prevalencia, el estadio, infraestructura de laboratorio y la disponibilidad de pruebas especializadas (13).

Hoy en día, los métodos diagnósticos de leptospirosis basados en métodos moleculares modernos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), son muy recomendables porque son de utilidad para la identificación de diferentes patógenos por ende tienen varias ventajas sobre los métodos convencionales; es decir tienen alta sensibilidad de detección serológica y velocidad de adquisición de resultados (42).

1.12.4 Diagnóstico En humanos

Si se sospecha clínicamente de leptospira y se confirma epidemiológicamente, se solicitan análisis de líquido cefalorraquídeo y orina para hemocultivo en medio Fletcher dentro de los primeros 5 a 7 días antes de iniciar la terapia con antibióticos para evitar la invalidación de la muestra. El método serológico más utilizado es la prueba de aglutinación macroscópica

MAT, que consiste en mezclar suero y cultivos bacterianos para medir la capacidad de aglutinación del suero. Los títulos específicos de IgM e IgG confirman el serotipo y el diagnóstico se determina mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELIZA) y otras pruebas de laboratorio, además de estudios clínicos y epidemiológicos (43).

1.13 Tratamiento

No se han logrado avances significativos en el tratamiento de la leptospirosis. El tratamiento de elección sigue siendo la administración de penicilina o tetraciclina. Incluso en estadios avanzados, el uso de penicilina reduce los síntomas y la duración de la leptospiruria. La doxiciclina se usa para prevenir la leptospirosis (44).

El tratamiento adecuado incluye cuidados de apoyo, es decir rehidratación si se produce pérdidas de líquidos y tratamientos con antibióticos. Los fármacos más utilizados son los betalactámicos. Es importante señalar que leptospira spp es sensible a la mayoría de los antibióticos disponibles comercialmente, por lo que la gravedad de la enfermedad está relacionada con el diagnóstico tardío más que con el tratamiento (45).

1.14 Prevención y Control

1.14.1 Medidas sobre el agente

Los médicos veterinarios utilizan vacunas inactivadas para reducir la infección humana limitando el reservorio, el control sanitario de los animales de importación, vacunación de los animales (46).

1.14.2 Medidas sobre el huésped y vías de transmisión

Otra de las medidas implica el control de roedores, la eliminación de aguas contaminadas y medidas de protección físicas para personas en riesgo de exposición ocupacional. Debido a la enorme abundancia de roedores domésticos y salvajes, esta enfermedad es muy difícil de erradicar (10)

1.14.3 Medidas sobre el huésped susceptible

Se debe prestar atención a los grupos de riesgo, por ejemplo, los empleados cuyo trabajo implica el contacto directo con la orina de los animales. Ocupaciones con contacto directo o indirecto (por ejemplo, agua contaminada con orina) como: veterinarios, trabajadores de mataderos, agricultores, técnicos en control de roedores y trabajadores públicos de alcantarillado, cortadores de caña de azúcar, productores de arroz, mineros, etc. (46).

Se debe tomar precauciones usando equipo de protección (botas, guantes) al realizar estas

tareas, no se debe beber agua de fuentes inseguras, no se debe caminar descalzo en áreas inundadas y tampoco bañarse en aguas estancadas que puedan estar contaminadas con desechos animales; educar y difundir conocimientos sobre como se transmiten las enfermedades y como prevenirlas (13).

La presente investigación tiene por objetivo lo siguiente:

1.15 OBJETIVO GENERAL

Identificar la incidencia de *leptospira icterohemorrágica*. en roedores y aguas residuales mediante técnica de laboratorio PCR en el sector sur de la ciudad de Machala

1.15.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Estimar la prevalencia de *Leptospira icterohemorrhagica* en aguas residuales y roedores en el sector sur
- Elaborar un mapa epidemiológico a partir de la identificación de la presencia o ausencia de *Leptospira icterohemorrhagica* en el sector sur

CAPÍTULO II

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Tipo de Estudio

El presente trabajo, es un estudio de tipo transversal porque se lo ejecuto en un periodo corto de tiempo, procediendo con la toma de muestra se realiza en un tiempo determinado, para buscar la presencia o ausencia de *Leptospira*

2.2 Paradigma

Nuestra investigación tiene como paradigma identificar la presencia de *Leptospira icterohemorrhagica* en ratas capturadas en la zona sur de la ciudad de Machala, así como también en muestras de agua residuales de los diferentes lugares en esta zona.

2.3 Ubicación del experimento

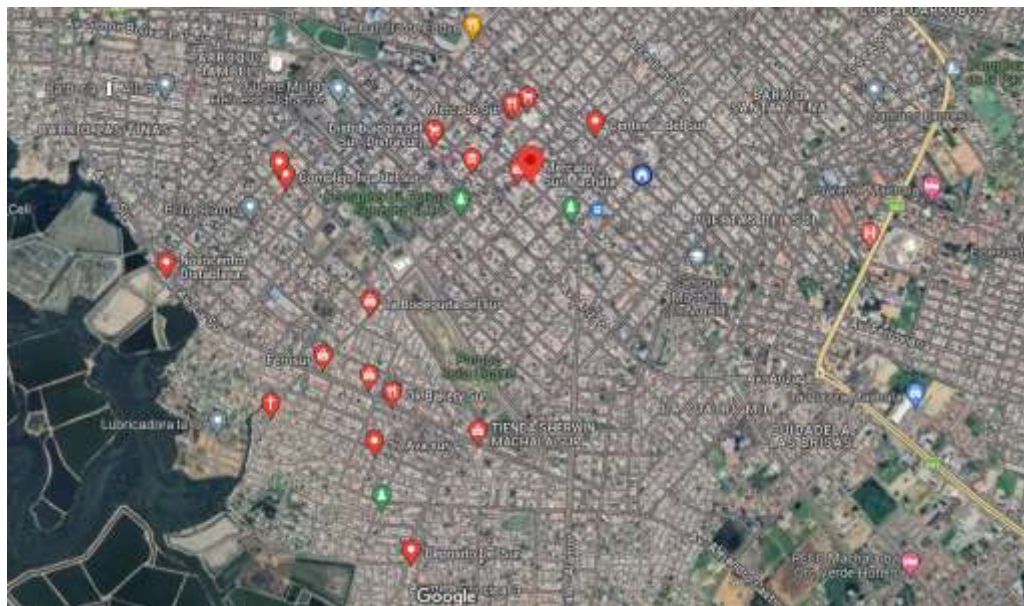
La presente investigación se llevó a cabo en el cantón Machala provincia de El Oro, en la zona sur de la ciudad, en la investigación se analizará la presencia o ausencia de leptospira icterohemorrágica en roedores y aguas residuales en los sectores ubicados dentro de la zona sur de Machala, que tiene las siguientes coordenadas:

Hemisferio: Sur

Zona: 17

Sur: 3°15'38"

Oeste: 79°57'31"



2.4 Población

En este estudio, la población de interés abarca a todos los roedores que fueron capturadas en el sector sur del cantón Machala, especies como *Mus musculus*, *Ratus ratus*, *Ratus novergicus*

2.5 Muestra

La muestra se seleccionó de los roedores capturados en la zona sur de Machala durante los meses de mayo y junio. Se realizó la captura de 25 roedores, utilizando un nivel de confianza de 97% y un margen de error del 5%. Se empleó una proporción estimada y fracaso del 50%

N = Población = 50

Z^2_{α} = Nivel de confiabilidad (97%)=2.17

E^2 = Nivel de error (5%)= 0.05

p = Proporción de éxito (50%)

q = Proporción de fracaso (50%)

Cálculo de tamaño de la muestra finita

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{E^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

$$n = \frac{50 * (2.17)^2 * 0,5 * 0,5}{(0,05)^2 * (50 - 1) + (2.17)^2 * 0,5 * 0,5}$$

$$n = \frac{50 * 4.70 * 0.25}{0.0025 * 49 + 4.70 * 0.25}$$

$$n = \frac{58,86}{0,122 + 1,177}$$

$$n = 45,29$$

$$n = 46$$

2.6 Variables

- Todos los roedores encontrados en la zona sur de Machala.
- Aguas residuales presentes en la zona sur de Machala

2.7 Materiales y reactivos

2.7.1 Equipos de protección personal

- Guantes sin talco
- Mascarilla 95
- Cofia descartable
- Gafas de protección
- Zapatones descartables
- Scrubs
- Bata quirúrgica mangas largas (descartables)

2.7.2 Materiales para realizar la necropsia

- Yodo jabonoso
- Alcohol
- Papel Toalla
- Algodón
- Tijera
- Papel de empaque
- Cinta de papel
- Marcadores “*Sharpie*” **color negro**
- Regla
- Cloroformo
- Funda negra

2.7.3 Materiales de recolección de muestras

- Equipo de disección
- Jeringuillas de: 3ml, (sangre)
- Tubo para muestra de sangre
 - Con EDTA (tapa lila)
- Crioviales de 1.5ml (orina, tráquea, pulmón, intestino, riñón e hígado)
- Tubos eppendorf

2.7.4 Material de registro

- Hoja de registro (número de roedor, lugar de captura, fecha de captura, fecha de necropsia, especie, sexo, color, longitud de cuerpo, cola y orejas, nombre de quien realiza la necropsia, detallar muestras recolectadas)

2.7.5 Material para el descarte del roedor

- Fundas rojas
- Yodo jabonoso
- Alcohol
- Papel toalla
- Cinta de papel

2.8 Muestra de órganos

Se obtendrán muestras de sangre, hígado, bazo y riñones obtenida de roedores, presentes en la zona sur del cantón Machala entre los meses de mayo y junio, a los cuales se les realizara un estudio molecular mediante PCR para identificar *Leptospira*.

2.9 Procedimiento Previo A La Necropsia

2.9.1 Para el equipamiento del personal:

1. La persona que realizará la necropsia deberá vestir su scrub médico
2. Además, deberá utilizar: cofia, mandil desechable, zapatones y mascarilla

2.9.2 Para la limpieza del mesón:

1. Deberá colocar un poco de yodo jabonoso
2. Con el papel toalla realizar movimientos circulares en el área en que va a trabajar.
3. Colocar alcohol sobre el área que acaba de limpiar con yodo.
4. Repetir el paso 2, hasta no ver coloración amarilla sobre el mesón.
5. Una vez que se ha desinfectado el lugar de trabajo, colocarse doble guante y encintar las muñecas.

Nota: la desinfección del mesón también deberá realizarse al terminar la necropsia.

2.9.3 Preparación del material a utilizar:

1. Se le asignará un código al roedor
2. El código asignado deberá de rotularse en los tubos a utilizar (viales, tubos para muestra de sangre, eppendorf) (SC XXX)
3. El papel empaque deberá ser cortado en un cuadrado que será proporcional al tamaño del individuo a estudiar.
4. Pegar los bordes del papel ya cortado sobre el mesón.
5. Escribir en una de las esquinas del papel: **código, fecha de captura, lugar de captura, fecha de necropsia, peso, sexo, especie, longitud de oreja, cuerpo y cola**
6. Cortar 4 pedazos de cinta de papel para colocar las extremidades del animal extendidas.

2.9.4 Para el sacrificio del animal:

1. Realizar de 3 a 4 torundas de algodón.
2. Humedecer con Cloroformo las torundas de algodón previamente realizadas
3. Colocar la trampa con el roedor dentro de una funda negra
4. Introducir las torundas de algodón humedecidas en la funda sobre la trampa y a sus costados
5. Quitar el área de la funda y esperar 1 a 2 minutos.
6. Pasados los 2 minutos deberá mover ligeramente la funda de izquierda a derecha para verificar si el roedor ya está inconsciente.
7. Procederá a retirar a la rata de la jaula

2.9.5 Para la toma de muestra de sangre:

1. Posterior al sacrificio del roedor se lo colocará decúbito dorsal sobre el papel de empaque, manteniendo una de las torundas de algodón sobre el rostro (cubriendo boca y fosas nasales).
2. Se extenderán las extremidades y se procederá a atar sus extremidades anteriores y posteriores, colocando cinta sobre las mismas.
3. Se deberá ubicar el corazón mediante palpación
4. Punzar con la jeringuilla para extraer la sangre
5. Colocar la sangre recolectada en el tubo tapa lila

Nota: en caso de no poder extraer la sangre por la técnica previamente mencionada, se deberá abrir rápidamente el tórax del animal teniendo cuidado de no perforar el corazón, para de esta manera visualizar el corazón y posteriormente lograr extraer la muestra sanguínea.

6. Tomar al roedor y ponerlo sobre la balanza, para obtener así el peso del animal.
7. Repetir paso 1 y 2 (colocar al animal sobre el papel empaque y extender sus extremidades)
8. Proceder a la recolección de órganos.

2.9.6 Para la disección del animal:

1. Elevar la piel con una pinza diente de ratón y usando la tijera punta roma realizar una incisión longitudinal desde la sínfisis pubiana hasta el cartílago xifoides.
2. Durante este paso se debe tener cuidado de no incidir en el estómago o intestino.
Nota: Se utilizará una pinza diente de ratón para levantar la pared abdominal.
3. Prolongar la incisión hasta las dos ramas de la mandíbula.
4. Se revisa el peritoneo, la posición de las vísceras.
5. Se toman muestras que se juzguen necesarias para exámenes bacteriológicos, con el fin de evitar la contaminación causada por manipulaciones posteriores.

2.9.7 Para la toma de muestras de la cavidad torácica:

1. Con el uso de pinzas deberá recolectar la tráquea y una pequeña porción del pulmón

(no importa si es el derecho o el izquierdo), y ambos órganos se colocarán en el mismo criovial

2.9.8 Para la toma de muestras de la cavidad abdominal:

1. Recolectar una porción de cualquier lóbulo del hígado y colocar en el criovial
2. Extraer una porción del intestino (que no tenga contenido) e introducirlo en el criovial
3. Tomar una pequeña porción del riñón e introducirlo en un criovial.
4. Se deberá examinar la vejiga del animal, si se encuentra plétora deberá introducir la jeringuilla cuidadosamente y extraerá la muestra de orina, misma si hay contenido se colocará en un criovial.

2.9.9 Para el registro de datos del animal:

1. Medir la longitud de las orejas, cuerpo y cola.
2. Identificar el sexo del animal
3. Determinar por las características fenotípicas del roedor la especie y el color (*Rattus rattus*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*)
4. Anotar la información en la hoja de registro
5. Tomar una fotografía de los datos anotados en el papel de empaque.

2.9.10 Para el almacenamiento de muestras colectadas

1. Los crioviales serán almacenados en una caja que tendrá rotulada con cinta de papel el nombre con su respectivo órgano extraído; por ejemplo: “**MUESTRAS DE HIGADO - LEPTOSPIRA - RATAS**” (y con el código desde que se empezó, hasta que se culminó)
2. Todos los tubos que fueron almacenados en las diferentes cajas deberán permanecer en el congelador -80°C vertical hasta que sean procesadas.

2.9.11 Para el descarte del animal:

1. Concluido con los pasos del registro de los datos del animal, continuará envolviendo al roedor en el papel de empaque previamente utilizado.
2. Envolver con cinta para evitar que se derrame, o rompa el papel.
3. Introducir el paquete que se acaba de realizar en la funda roja.

4. El material de bioseguridad que se utilice se lo colocara en una funda roja distinta.
5. Cada una de las fundas deberá tener pegada la etiqueta que será llenada según corresponda.

2.10 Protocolo para extracción de ADN

2.10.1 Materiales Para Extracción de ADN

- ***Kit para sangre:*** Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
 - PureLink Genomic Wash Buffer1
 - PureLink Genomic Wash Buffer 2
 - PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer
 - PureLink Genomic Elution Buffer
 - PureLink Genomic Digestion
 - Invitrogen RNase A
 - Proteinsase K
- ***Kit para riñon:*** Wizard SV Genomic DNA Purification System
 - Wizard SV Lysis Buffer
 - Column Wash Solution
 - Nuclei Lysis Solution
 - EDTA 0.5 M (Ph 8)
 - Nuclease-Free Wather
 - RNase A
- ***Kit para agua:*** GeneJET Genomic DNA Purification kit
 - Elution Buffer
 - Wash Buffer I
 - Wash Buffer II
 - Digestion Solution (room temperatura)

- Lysis Solution
- Etanol
- Agua Destilada
- Termociclador
- Centrifuga

2.11 Procedimiento para la extracción de ADN

2.11.1 Extracción ADN Tejido - Riñón

1. Mediante el uso de una microgramera debería pesar una porción del riñón para obtener 20 mg de tejido, acto seguido coloque dicha porción en un tubo de 1.5ml estéril, mismo que deberá tener rotulado el código de la muestra que contiene
2. Agregue 275 ul de mezcla de solución de digestión a cada tubo

Para obtener digestion solution (11 muestras)

Nuclei lysis 200 ul x11 = 2200

0.5M EDTA 50 ul x11 = 550

Proteinasa K 20x11 = 220

RNasa A 5x11 = 55

Total = 3025 / 11= **275 ul Volumen total**

3. Se debe incubar los tubos de muestra durante la noche; de 16 a 18 horas, en un bloque térmico a 55°C
4. Se debe agregar 250 ul de tampón de lisis Wizard SV a cada muestra. Y dar vortex
5. Procese el lisado lo antes posible después de agregar Lysis Buffer. Si se congelan a -70° C, los lisados se den descongelar y calentar a 55°C durante una hora antes del procesamiento. Los lisados deben estar calientes para su procesamiento

2.11.2 Purificación de ADN genómico a partir de lisado mediante microcentrifuga

6. Transfiera cada lisado de muestra del tubo de 1,5 ml a un conjunto de minicolumna Wizard SV independiente.
7. Haga girar el conjunto a 13.000x g durante 3 minutos

8. Retire la mini columna del conjunto de lavado y deseche el líquido del tubo de recogida. Vuelva a colocar la mini columna en el tubo de recogida.
9. Agregue 650 ul de solución de lavado de columna (CWA con etanol al 95% agregado) a cada conjunto. Centrifugar a 13.000x g durante 1 minuto. Deseche el líquido del tubo de recolección. Repita este paso para obtener un total de 4 lavados
10. Deseche el líquido del tubo de recolección y vuelva a ensamblar el conjunto de mini columna. Centrifugar durante 2 minutos a 13.000 x g para secar la matriz de unión.
11. Transfiera la mini columna Wizard SV a un tubo nuevo de 1.5 ml. Añadir 100 ul de Nuclease-Free Water a temperatura ambiente. Incubar por 2 minutos a temperatura ambiente.
12. Centrifugue el conjunto de mini columna /tubo de elución a 13.000 x g durante 2 minutos. No deseche el líquido en el tubo de elución
13. Agregue 250 ul adicionales de agua libre de nucleasas (Nuclease-Free Water) e incube a temperatura ambiente durante 2 minutos. Centrifugar el conjunto de microcolumna/tubo de elución a 13.000 x g durante 2 minutos
14. Retire la mini columna y almacene el ADN purificado entre -20 y -70°C

2.12 Extracción ADN - Sangre

2.12.1 Protocolo de células de mamífero y lisado sanguíneo

1. Coloque un baño de agua o un bloque térmico a 55° C
2. Añadir 20 ul de proteinasa a un tubo de microcentrífuga estéril
3. Proceso de células o muestra de sangre
 - Para celula adherente (hasta 5x10⁶celulas). Retire el medio de crecimiento y recolecte las células mediante tripisinizacion o un método de elección resuspender las células en 200 ul PBS
 - Para células en suspensión (hasta 5x10⁶ celulas). Coseche las células mediante centrifugación. Retire el medio de crecimiento. Resuspender células 200 ul de PBS

- En un tubo de microcentrífuga estéril agregue hasta 200 ul de muestra de sangre fresca o congelada (si usa <200ul de muestra de sangre, ajuste el volumen de la muestra a 200 ul usando PBS. Para procesar muestras de sangre >200 ul y hasta 1 ml, aumente todos los volúmenes de reactivo en consecuencia.
- 4. Transfiera 200 ul de células o sangre en PBS al tubo que contiene proteinasa K del paso dos
- 5. Agregue 20 ul de RNasa A a la muestra. Mezcle bien mediante agitación breve e incube a temperatura ambiente durante 2 minutos
- 6. Agregue 200 ul de tampón de unión/lisis genómica PureLink y mezcle bien con un vortex para obtener una solución homogénea
- 7. Incubar a 55°C durante 10 min para promover la digestión de proteínas
- 8. Añadir 200 ul de etanol al 96-100% al lisado. Mezclar bien mediante vortex para obtener una solución homogénea
- 9. Continúe inmediatamente con el protocolo de purificación

2.12.2 Protocolo de purificación

El procedimiento de purificación está diseñado para purificar ADN genómico mediante un procedimiento basado en columna giratoria en un tiempo total de 10 a 15 minutos.

1. Retire el paquete una columna de centrifugación PureLink en un tubo de recogida
2. Agregue el lisado (-640ul) preparado con PureLink Genomic Lysis/Binding buffer y etanol a la columna de centrifugación
3. Centrifugar la columna a 10.000 x g durante un minuto a temperatura ambiente
4. Deseche el tubo de recolección y coloque la columna de centrifugación en un tubo de recolección PureLink limpio suministrado con el kit
5. Agregue 500 ul de Wash Buffer 1 preparado con etanol de la columna
6. Centrifugar la columna a 10.000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente

7. Deseche el tubo de recolección y coloque la columna de centrifugación en un tubo de recolección PureLink limpio suministrado con el kit
8. Añadir 500 ul de Wash Buffer 2 preparado con etanol a la columna
9. Centrifugue la columna a máxima velocidad durante 3 minutos a temperatura ambiente. Deseche el tubo de recolección
10. Coloque la columna de centrifugación en un tubo de microcentrifug esteril de 1.5 ml
11. Agregue 60 ul de PureLink Genomic Elution Buffer de la columna. Elija el volumen de elución adecuado para sus necesidades.
12. Incube a temperatura ambiente por un minuto. Centrifugar la columna a máxima velocidad durante un minuto a temperatura ambiente.
13. Para recuperar mas ADN, realice un segundo paso de elución utilizando el mismo volumen de tampón de elución que la primera elución.
14. Centrifugar la columna a máxima velocidad durante 1.5 minutos a temperatura ambiente
15. Utilice ADN para la aplicación posterior deseada o almacene el ADN purificado a 4°C (a corto plazo)

2.13 Extracción ADN - Aguas

1. Primero se centrifuga las muestras por 1 hora a 3 rpm
2. Luego se bota el agua para quedarnos con el pellet y es llevado a la cabina. Y se procede a utilizar el kit (digestion solution) se toma una pipeta de 200 ul porque necesitamos 180 ul del digestion solution.
3. Se repele la muestra para que se mezcle el pellet con el digestion solution.
4. Se retira la proteinasa del congelador y se deja reposar, y se va tomar 20 ul y lo colocamos a los tubos sin repeler y se deja actuar por 1 min
5. Se coloca el tubo falcón en el bortex para que se mezcle toda la muestra aproximadamente 10 seg.
6. Se traspa del tubo falcón a los endor para luego ser llevados al termociclador 30 min a 8000 rpm

7. Luego se va a colocar 20 ul de RNase ad solution y se le da vortex por 3 seg, y se deja reposar por 10 min al ambiente.
8. Se va a colocar 20 ul de Lysis solution y se da vortex por 15 seg. Y se coloca 400 ul de 50% de etanol y se le da vortex por 3 seg.
9. Se arma el tubo de lavado y encima la columna de filtrado para asi colocarle las muestras 830 ul. Y se lleva a la centrifuga a 10.000 rpm por 1 min
10. Se desecha el sobrante del tubo, pero sin botar el tubo. Lo que quedo en la muestra se coloca en el filtro de lavado con el tubo para volver hacer centrifuga a 10.000 rpm por 1 min.
11. Se bota los tubos para hacer lavado de buffer N°1 y se coloca 500 ul y se centrifuga a 12.000 rpm por 1 min. Y se bota el residuo del tubo
12. Se vuelve hacer otro lavado con el buffer N° 2 colocándole 500 ul y centrifugando a 14.000 rpm por 3 min.
13. Se bota el tubo y queda la columna de filtrado para colocarse en el ededor final
14. Se coloca 60ul elution buffer y se lo deja actuar por 2 min a temperatura ambiente el mismo que debe caer en el centro de la columna para ser filtrado.
15. Se centrifuga a 10.000 rpm por 1 min.

2.14 PROCEDIMIENTO PARA LA PRUEBA qPCR

La identificación de *Leptospira*, se realiza por medio de una qPCR utilizando primers específicos según la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de primers para identificación de *Leptospira* spp (2,3).

Set	Gen	Descripcion	Nombre	Secuencia (5' - 3')	Pro be dye	Quenc her	T° de anillado	Tam año (bp)	Reacci ón
1	b-actin	gen b-actina de mamíferos	F_actin	GGC TCY ATY CTG GCC TC			60°C	-	1
			R_actin	GCA YTT GCG GTG SAC RAT G					
			P_actin	Cy5-TAC TCC TGC TTG CTG ATC CAC ATC-BHQ2	Cy5	BHQ2			
2	LipL32	gen lipL32 de Leptosp	F_lip32	AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG			60°C	242	
			R_lip32	GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT					

		irras patógenas	taq-189P	FAM-AAA GCC AGG ACA AGC GCC G-BHQ1	FAM	BHQ1			
3	SecY	gen <i>secY</i> de <i>L.interrigans</i>	F_Lint2	CTT GAG CCT GCG CGT TAY C			63°C	176	2
			R_Lint2	CCG ATA ATT CCA GCG AAG ATC					
			TaqLint2	HEX-CTC ATT TGG TTA GGA GAA CAG ATC A-BHQ1	HEX	BHQ1			
4	rrs(16S)	gen rrs(16s) de <i>Leptospiras patógenas</i>	F_Lept	5' ¹⁷¹ CCCGCGTCCGATTAG3'			60°C	87	
			R_Lept	5' ²⁵⁸ TCCATTGTGGCCGR ^{A/G} ACAC3					
			P_Lept	5'²⁰⁵(FAM) CTCACCAAGGCGACGATCGGT AGC²²⁸ 3' (BHQ1)	FAM	BHQ1			

2.14.1 Preparación del Master Mix:

1. Preparar insumos necesarios, placas de 96 pocillos o strips, y colocarlos dentro de la cabina de bioseguridad.
2. Aplicar por 10 minutos luz UV.
3. Apagar luz UV y prender el “Blower”.
4. Descongelar enzima, primers y sondas necesarias para preparar la reacción.
5. Realizar el cálculo para el número de reacciones que se vayan a llevar a cabo, utilizando los valores de volumen por reactivo especificados en la Tabla 2.

Tabla 2. Reactivos para la preparación del Master Mix en las amplificaciones por qPCR para leptospira.

Reactivo	Volumen para 1 reacción (uL)
Mix Enzima Universal Master Mix Invitrogen (2X)	7.5
Primer Forward (Gen 1)	0.3
Primer Reverse (Gen 1)	0.3
Sonda (Gen 1)	0.2
Primer Forward (Gen 2)	0.3
Primer Reverse (Gen 2)	0.3
Sonda (Gen 2)	0.2
Agua Ultra Pura	2.4
ADN	3.5
Volumen Mix	15

Tabla 3. Programa del termociclador para las reacciones por PCR dirigidas a *Leptospira*.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ramp Rate (°C/s)	Número de Ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min	4.4	1
Desnaturalización	95	15 s	4.4	45*
Hibridación Y extensión**	60	1 min	2.2	

CAPÍTULO III

III RESULTADOS

En la siguiente tabla (tabla 4), se encuentran expuestas 25 datos obtenidos. En el caso de los roedores se experimentos con 25 ejemplares de los cuales se extrajo 20 muestras de sangre, y 5 muestras de riñón (tabla 5) de la zona sur de la ciudad de Machala. En el caso de los roedores se realizó prueba molecular de PCR (Reacción de la cadena de polimerasa). Los resultados obtenidos fueron claros, las muestras analizadas de roedores no mostraron presencia de *Leptospira*. Este hallazgo nos indica una baja prevalencia de la bacteria en la población de roedores en las zonas investigadas, lo cual podría estar relacionada con las condiciones ambientales existentes en el momento de la recolección de los ejemplares.

Tabla 4 Resultados obtenidos de prueba qPCR, en sangre de roedores

Código	SC239
Fecha de Captura	11/5/2024
Lugar de Captura	SUR Manuel Estomba y Santa Rosa (Antiguo Aeropuerto)
Especie	Ratus ratus
Fecha de Extracción	1/Julio/2024
Fecha de PCR	11/julio/2024
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	SC256
Fecha de Captura	30/5/2024
Lugar de Captura	SUR Manuel Estomba y Santa Rosa (Antiguo Aeropuerto)
Especie	Ratus novergicus
Fecha de Extracción	1/Julio/2024
Fecha de PCR	11/julio/2024
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	SC257
Fecha de Captura	30/5/2024
Lugar de Captura	SUR Manuel Estomba y Santa Rosa (Antiguo Aeropuerto)
Especie	Ratus ratus
Fecha de Extracción	1/Julio/2024
Fecha de PCR	11/julio/2024
(CT NAlipl32) FAM	N/A

(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	SC258
Fecha de Captura	30/5/2024
Lugar de Captura	SUR Manuel Estomba y Santa Rosa (Antiguo Aeropuerto)
Especie	Ratus ratus
Fecha de Extracción	1/Julio/2024
Fecha de PCR	11/julio/2024
(CT NAlip132) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	SC259
Fecha de Captura	30/5/2024
Lugar de Captura	SUR Manuel Estomba y Santa Rosa (Antiguo Aeropuerto)
Especie	Ratus ratus
Fecha de Extracción	1/Julio/2024
Fecha de PCR	11/julio/2024
(CT NAlip132) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	SC260
Fecha de Captura	30/5/2024
Lugar de Captura	SUR Manuel Estomba y Santa Rosa (Antiguo Aeropuerto)
Especie	Ratus novergicus
Fecha de Extracción	1/Julio/2024
Fecha de PCR	11/julio/2024
(CT NAlip132) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	SC261
Fecha de Captura	30/5/2024
Lugar de Captura	SUR Manuel Estomba y Santa Rosa (Antiguo Aeropuerto)
Especie	Ratus ratus
Fecha de Extracción	1/Julio/2024
Fecha de PCR	11/julio/2024
(CT NAlip132) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	SC288
Fecha de Captura	5/junio/2024
Lugar de Captura	SUR Palmeras y Avenida Alcides Pesantes
Especie	Ratus ratus
Fecha de Extracción	1/Julio/2024
Fecha de PCR	11/julio/2024
(CT NAlip132) FAM	N/A

(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	SC289
Fecha de Captura	8/junio/2024
Lugar de Captura	SUR Avenida Juan Palomino y José Borja Barrezueta (Parque Picapiedra)
Especie	Ratus ratus
Fecha de Extracción	1/Julio/2024
Fecha de PCR	11/julio/2024
(CT NAlip132) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	SC292
Fecha de Captura	10/junio/2024
Lugar de Captura	SUR Avenida 25 de Junio y Calle Arizaga (Estadio 9 de Mayo)
Especie	Ratus ratus
Fecha de Extracción	1/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	SC294
Fecha de Captura	06/junio/2024
Lugar de Captura	SUR Bolivar entre Junin y Juan Montalvo (Mercado Central)
Especie	Ratus ratus
Fecha de Extracción	1/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
(CT NAlip132) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	SC295
Fecha de Captura	07/junio/2024
Lugar de Captura	SUR Avenida Colón Tinoco (Cementerio Municipal)
Especie	Mus musculus
Fecha de Extracción	1/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
(CT NAlip132) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	SC296
Fecha de Captura	10/junio/2024
Lugar de Captura	SUR Avenida Colón Tinoco (Cementerio Municipal)
Especie	Ratus ratus
Fecha de Extracción	1/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024

(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	SC297
Fecha de Captura	07/junio/2024
Lugar de Captura	SUR Avenida Colón Tinoco (Cementerio Municipal)
Especie	Ratus ratus
Fecha de Extracción	1/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	SC306
Fecha de Captura	14/junio/2024
Lugar de Captura	SUR Calle Principal y Circunvalación Sur (Parque la Victoria)
Especie	Ratus novergicus
Fecha de Extracción	1/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	SC309
Fecha de Captura	15/junio/2024
Lugar de Captura	SUR Avenida Colón Tinoco (Cementerio Municipal)
Especie	Ratus novergicus
Fecha de Extracción	1/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	SC313
Fecha de Captura	14/junio/2024
Lugar de Captura	SUR Calle Principal y Circunvalación Sur (Parque la Victoria)
Especie	Ratus ratus
Fecha de Extracción	1/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	SC314
Fecha de Captura	15/junio/2024
Lugar de Captura	SUR Avenida Colón Tinoco (Cementerio Municipal)
Especie	Ratus ratus
Fecha de Extracción	1/Julio/2024

Fecha de PCR	12/julio/2024
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	SC317
Fecha de Captura	14/junio/2024
Lugar de Captura	SUR Calle Principal y Circunvalación Sur (Parque la Victoria)
Especie	Ratus ratus
Fecha de Extracción	1/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	SC318
Fecha de Captura	14/junio/2024
Lugar de Captura	SUR Calle Principal y Circunvalación Sur (Parque la Victoria)
Especie	Ratus ratus
Fecha de Extracción	1/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	SC323
Fecha de Captura	19/junio/2024
Lugar de Captura	SUR Avenida Circunvalación Sur y Carrera 7 ma Oeste (Parque Lineal)
Especie	Ratus ratus
Fecha de Extracción	1/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A

Tabla 5 Resultados obtenidos de prueba qPCR, en riñón de roedores

Código	SC257
Fecha de Captura	30/mayo/2024
Lugar de Captura	SUR Manuel Estomba y Santa Rosa (Antiguo Aeropuerto)
Especie	Ratus ratus
Fecha de Extracción	16/Julio/2024
Fecha de PCR	21/06/2024
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	SC299

Fecha de Captura	19/junio/2024
Lugar de Captura	SUR Avenida Circunvalación Sur y Carrera 7 ma Oeste (Parque Lineal)
Especie	Ratus novergicus
Fecha de Extracción	16/Julio/2024
Fecha de PCR	21/06/2024
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	SC315
Fecha de Captura	14/junio/2024
Lugar de Captura	SUR Calle Principal y Circunvalación Sur (Parque la Victoria)
Especie	Ratus ratus
Fecha de Extracción	16/Julio/2024
Fecha de PCR	21/06/2024
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	SC319
Fecha de Captura	19/junio/2024
Lugar de Captura	SUR Avenida Circunvalación Sur y Carrera 7 ma Oeste (Parque Lineal)
Especie	Ratus ratus
Fecha de Extracción	16/Julio/2024
Fecha de PCR	21/06/2024
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	SC321
Fecha de Captura	19/junio/2024
Lugar de Captura	SUR Avenida Circunvalación Sur y Carrera 7 ma Oeste (Parque Lineal)
Especie	Ratus ratus
Fecha de Extracción	16/Julio/2024
Fecha de PCR	21/06/2024
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A

Continuando, se recolectaron 25 muestras de aguas (tabla 6) residuales de la zona sur, las mismas que fueron analizadas mediante prueba de PCR para la detección de la *Leptospira*. Los resultados nos indicaron que no se encontró la presencia de la bacteria en ninguna de las muestras analizadas. Dicho resultado nos sugiere que en las aguas residuales estudiadas no hay contaminación por *Leptospira*, por lo cual no existe un riesgo de contaminación de esta bacteria a través de estas fuentes de agua, en las zonas estudiadas, lo cual disminuye el riesgo

potencial para la salud pública.

Tabla 6 Resultados obtenidos de prueba qPCR, en aguas residuales del sector sur del cantón Machala

Código	MA-MCH1
Fecha de Recolección	12/junio/2024
Fecha de Extracción	28/Junio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
Lugar de Muestreo	Parque Picapiedra
(CT NAlip132) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	MA-MCH2
Fecha de Recolección	12/junio/2024
Fecha de Extracción	28/Junio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
Lugar de Muestreo	Nuevo Pilo
(CT NAlip132) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	MA-MCH3
Fecha de Recolección	12/junio/2024
Fecha de Extracción	28/Junio/2024
Fecha de PCR	14/julio/2024
Lugar de Muestreo	Cámara de Industria
(CT NAlip132) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	MA-MCH4
Fecha de Recolección	12/junio/2024
Fecha de Extracción	28/Junio/2024
Fecha de PCR	15/julio/2024
Lugar de Muestreo	Cámara de Industria
(CT NAlip132) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	MA-MCH5
Fecha de Recolección	12/junio/2024
Fecha de Extracción	28/Junio/2024
Fecha de PCR	16/julio/2024
Lugar de Muestreo	Nuevo Pilo
(CT NAlip132) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	MA-MCH21
Fecha de Recolección	12/junio/2024
Fecha de Extracción	04/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024

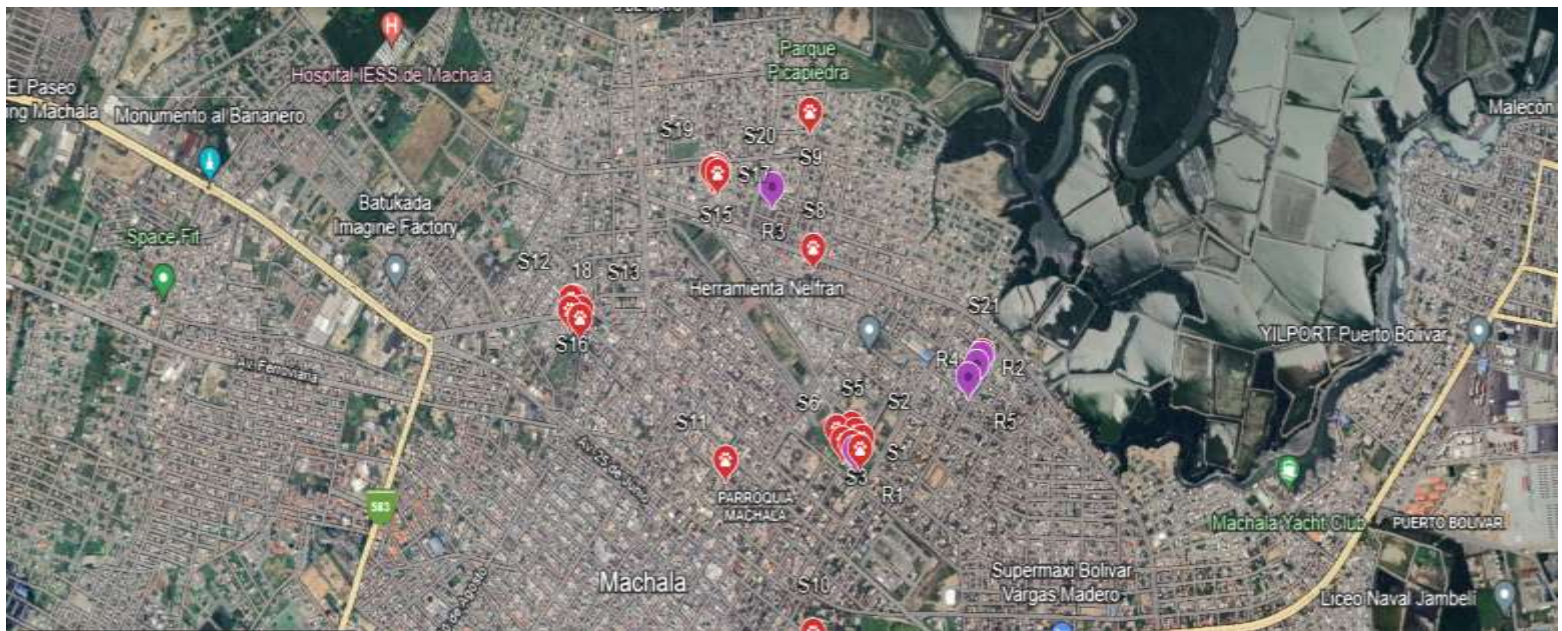
Lugar de Muestreo	Cámara de Industria
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	MA-MCH22
Fecha de Recolección	12/junio/2024
Fecha de Extracción	04/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
Lugar de Muestreo	Club de Leones
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	MA-MCH23
Fecha de Recolección	12/junio/2024
Fecha de Extracción	04/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
Lugar de Muestreo	Centro Forense
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	MA-MCH24
Fecha de Recolección	12/junio/2024
Fecha de Extracción	04/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
Lugar de Muestreo	Centro Forense (alrededores)
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	MA-MCH25
Fecha de Recolección	12/junio/2024
Fecha de Extracción	04/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
Lugar de Muestreo	Ciudadela San Ramon
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	MA-MCH26
Fecha de Recolección	12/junio/2024
Fecha de Extracción	04/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
Lugar de Muestreo	Ciudadela San Ramon (Alrededores)
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	MA-MCH27
Fecha de Recolección	12/junio/2024
Fecha de Extracción	04/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
Lugar de Muestreo	Ciudadela Venezuela

(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	MA-MCH28
Fecha de Recolección	12/junio/2024
Fecha de Extracción	04/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
Lugar de Muestreo	Ciudadela Venezuela (Alrededores)
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	MA-MCH29
Fecha de Recolección	12/junio/2024
Fecha de Extracción	04/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
Lugar de Muestreo	Ciudadela Brisas del Mar
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	MA-MCH30
Fecha de Recolección	12/junio/2024
Fecha de Extracción	04/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
Lugar de Muestreo	Parque ecológico
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	MA-MCH31
Fecha de Recolección	12/junio/2024
Fecha de Extracción	04/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
Lugar de Muestreo	Colegio Médicos El Oro
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	MA-MCH32
Fecha de Recolección	12/junio/2024
Fecha de Extracción	04/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
Lugar de Muestreo	Colegio Médicos El Oro (Alredores)
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	MA-MCH33
Fecha de Recolección	12/junio/2024
Fecha de Extracción	04/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
Lugar de Muestreo	Alrededores cárcel de Machala
(CT NAlipl32) FAM	N/A

(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	MA-MCH34
Fecha de Recolección	12/junio/2024
Fecha de Extracción	04/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
Lugar de Muestreo	Alrededores cárcel de Machala
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	MA-MCH35
Fecha de Recolección	12/junio/2024
Fecha de Extracción	04/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
Lugar de Muestreo	Parque Picapiedra
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	MA-MCH36
Fecha de Recolección	12/junio/2024
Fecha de Extracción	04/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
Lugar de Muestreo	La Roldós
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	MA-MCH37
Fecha de Recolección	12/junio/2024
Fecha de Extracción	04/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
Lugar de Muestreo	La Roldós (Alrededores)
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	MA-MCH38
Fecha de Recolección	12/junio/2024
Fecha de Extracción	04/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
Lugar de Muestreo	Barrio Lilian María
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A
Código	MA-MCH39
Fecha de Recolección	12/junio/2024
Fecha de Extracción	04/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
Lugar de Muestreo	Barrio Lilian María (alrededores)
(CT NAlipl32) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A

Resultado Qpcr	N/A
Código	MA-MCH40
Fecha de Recolección	12/junio/2024
Fecha de Extracción	04/Julio/2024
Fecha de PCR	12/julio/2024
Lugar de Muestreo	Parque Lineal
(CT NAlip132) FAM	N/A
(CTNA16s) FAM	N/A
Resultado Qpcr	N/A

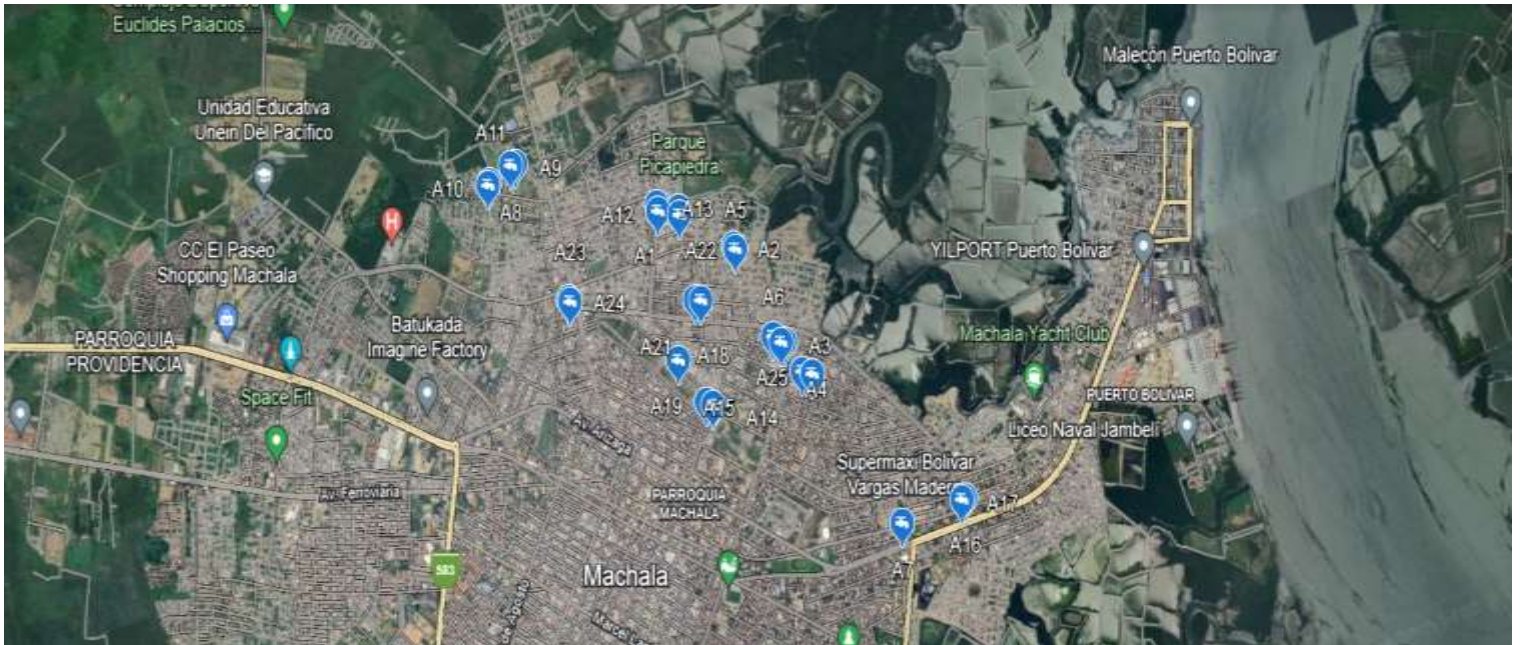
Imagen 1 Mapa epidemiológico de roedores capturados en la zona sur de Machala



Elaborado por: autora

En el presente mapa epidemiológico, se observa cada uno de los distintos lugares donde fueron capturados los roedores que corresponden a la zona sur de Machala, que en total fueron 25. Pero recalando que 20 muestras fueron analizadas en sangre, y están representadas de color rojo y las 5 muestras fueron analizadas de riñón, estas representadas de color morado. Por ende las 25 muestras analizadas mediante la técnica de qPCR nos dio como resultado negativo, siendo ausencia de este patógeno en la zona estudiada.

Imagen 2 Mapa epidemiológico de muestras de aguas recolectadas, en la zona sur de machala



Elaborado por: autora

En el presente mapa epidemiológico, se observa cada uno de los distintos lugares donde fueron recolectadas las aguas que corresponden a la zona sur de Machala, estas siendo identificadas de color celeste, y mediante la realización de la técnica por qPCR se obtuvieron resultados negativos a la bacteria, en la zona de recolección de muestra.

3.1 Discusión

Aunque los resultados del estudio sobre *Leptospira* que se está llevando a cabo en la zona examinada han arrojado resultados negativos, esto no siempre significa que la bacteria esté ausente en la zona. La prevalencia de *Leptospira* en los últimos años, donde se han identificado cepas activas, sugiere que la bacteria puede estar presente pero no detectada en este caso. Es vital recordar que la *Leptospira* se puede encontrar en otros reservorios de animales como perros, gatos y animales salvajes, además de roedores. Por esta razón resulta fundamental analizar este contexto histórico a la hora de interpretar los resultados actuales, ya que las variables estacionales, la metodología utilizada y las condiciones ambientales pueden influir en la detección.

En relación con lo anterior descrito, se destaca una investigación realizada en Ecuador por Yaguargos. J 2021, quien realizó la vigilancia de enfermedades epidemiológicas desde el 2016 al 2020, reportándose 564 casos de leptospirosis, con mayor prevalencia en el año 2017, las provincias más afectadas fueron Zamora Chinchipe con un reporte del 29,69%, Manabí con el 15,65% y en tercer lugar Cotopaxi y Esmeralda reportaron 9,38%. Con menor prevalencia 1 caso en cada una de las provincias de Santa Elena, Los Ríos, EL Oro y Morona Santiago representando el 1,56% (47). Complementando esta información Salón. A, et al. 2020, recolectó sueros de 29 mamíferos en la provincia de Guayaquil, 23 de ellos domésticos y 6 salvajes, en todos se encontró seropositivos para *Leptospira*, algunos inclusive con varios serobares (48). Lo que indica una alta circulación de la bacteria por estas regiones.

Por su parte, Pérez. M, et al 2020 informaron una prevalencia del 56.21%, de la bacteria leptospirosis en bovinos en la provincia de Manabí, con alta predominancia en los serovares de Pomona (28,57%) e Icterohaemorrhagiae (22,30%) (49), estos datos resaltan el impacto de la enfermedad en la ganadería. Finalmente se observaron resultados similares por Vitonera, R. et al. 2024, quien mostró que el 5% de la población canina dio positivo a IgM en Santa Rosa, El Oro, Ecuador, mostrándonos la prevalencia de infección aguda en este sector (50).

Estos estudios demuestran una distribución geográfica desigual y una alta prevalencia en ciertas áreas y especies, lo que sugiere la necesidad de intervenciones específicas y un

enfoque renovado en las medidas de prevención y control de la leptospirosis en Ecuador.

De acuerdo a Gonzales, et al. 2021. La leptospirosis afecta tanto a humanos como a animales. Estas bacterias se encuentran en el agua y en zonas húmedas y se propagan principalmente a través de la orina de animales infectados, en particular roedores (51). En este estudio se examinó la presencia de *Leptospira icterohemorrágica* en aguas residuales y roedores en el sur de la ciudad de Machala, la cual tiene clima tropical caracterizado por humedad y altas temperaturas generando condiciones óptimas para el desarrollo de *Leptospira*. Estos hallazgos nos subrayan la conexión existente entre las condiciones ambientales y la prevalencia de la enfermedad. Aránzazu, A. et al, 2020. Corroboró esta relación al señalar que la leptospirosis es más común en climas tropicales o subtropicales y afecta tanto a los humanos como a una variedad de mamíferos domésticos y salvajes, uno de sus principales afectados son los roedores (52). Ambos estudios destacan cómo características ambientales específicas, como el clima tropical y la alta humedad, contribuyen a la supervivencia y propagación de *Leptospira*, confirmando el papel esencial que juegan las condiciones climáticas en la epidemiología de la leptospirosis y la aparición de brotes en las zonas afectadas.

La ausencia del patógeno en los resultados encontrados actualmente es un hallazgo válido y esperado en el marco del contexto científico, puesto que se puede reflejar la existencia de variabilidad temporal en la presencia o ausencia del agente estudiado. Este resultado no anula la necesidad de un monitoreo continuo porque la detección puede ser intermitente y su ausencia en este momento no implica que el patógeno haya sido erradicado del área.

En este marco, Builes, et al 2019, encontró que existe una relación entre la lluvia y la sequía en el ciclo natural de la enfermedad, y que, debido a la variabilidad geográfica, factores sociodemográficos y eventos hidrológicos específicos, como el “fenómeno del niño”, la ocurrencia de leptospirosis se desplaza en diferentes regiones (53). De igual forma, en un estudio realizado en Ucrania entre 1972 y 2016 y publicado en 2017 se reveló que en áreas endémicas los serovares de *Leptospira* presentan cambios con el tiempo, ya que los principales reservorios naturales (ratas y pequeños mamíferos) no son los únicos que causan

la enfermedad, sino que también se introducen nuevos serovares en la región, lo que implica cambios en la etiología de leptospirosis y déficit en la efectividad de los medios diagnósticos (54). Esto significa que la vigilancia debe adaptarse a estos cambios en la etiología de la enfermedad y tener en cuenta la introducción de nuevas serovares que podrían dificultar la detección y el tratamiento de la leptospirosis. En conjunto, estos hallazgos resaltan la necesidad de un seguimiento y una adaptación continuos para gestionar eficazmente la leptospirosis en diversos entornos y circunstancias.

El análisis de los estudios realizados sobre leptospirosis nos revela una fuerte correlación entre la presencia de *Leptospira* y el agua contaminada, lo que adquiere particular importancia en el contexto de desastres naturales y fenómenos meteorológicos extremos. Los factores ambientales, como el aumento de las precipitaciones y el cambio del clima, son clave para la propagación de estas bacterias (55). En este sentido, el clima en la ciudad de Machala es tropical monzónico, sin embargo, se presentan cambios climáticos como la temporada de lluvias (diciembre-mayo) y la temporada seca (junio-noviembre), durante el período de muestreo en este estudio, se registraron condiciones predominantemente secas. Esto indica que las condiciones climáticas pueden haber influido significativamente en los resultados negativos, ya que dichas condiciones climáticas limitan la presencia detectable de *Leptospira* icterohemorrágica. Sin embargo, no debemos olvidar que a más de las aguas contaminadas existen una variedad de reservorios ecológicos que también juegan un papel importante en los eventos epidemiológicos de la bacteria.

CAPÍTULO IV

IV CONCLUSIONES

La investigación realizada en la zona sur de Machala, utilizando la técnica de laboratorio de PCR para detectar la presencia de *Leptospira icterohemorrágica* en aguas residuales y roedores, arrojó resultados negativos. Estos resultados muestran que tanto los roedores como las muestras de aguas residuales estaban libres de bacterias. Dado que *Leptospira* prospera en ambientes cálidos y húmedos, es probable que las condiciones secas experimentadas durante la recolección de muestras hayan tenido un impacto significativo en la ausencia de bacterias.

Aunque aún no se ha logrado el objetivo de crear un mapa epidemiológico para identificar la presencia de *Leptospira*, esta investigación proporciona información importante sobre la distribución actual de bacterias en el área y enfatiza la importancia de realizar investigaciones adicionales en una variedad de climas y períodos de tiempo. El estudio también enfatiza la importancia de un monitoreo continuo y completo, así como mejora nuestra comprensión de la epidemiología de la leptospirosis y su control en áreas donde la bacteria prospera.

CAPÍTULO V

V. RECOMENDACIONES

- La mejor manera de reducir la alta tasa de incidencia de la leptospirosis es aplicando estrategias de promoción de la salud como por ejemplo se recomienda aplicar una vigilancia estricta referente a una limpieza adecuada de las condiciones de vida en el hogar, protección de grupos de población de grupos de riesgo como niños menores de 5 años, embarazadas, adultos mayores y grupos de animales domésticos como perro y el ganado mediante la inmunización para evitar el contagio.
- Se debe inducir a la eliminación de roedores en el hogar y en lugares cercanos de la vivienda, si hubiese la probabilidad de existencia de estos animales, especialmente la limpieza adecuada de el orine y excremento de los mismos, como el uso eficaz del equipo de protección personal, cerrar los lugares donde hubiese espacio pequeños para evitar el paso de estos animales, también la implementación de trampas para matar al roedor, todas estas como estrategias para disminuir el riesgo de contagio de esta zoonosis.
- Continuar aplicando los métodos de recogida de muestra de sangre para cultivo como el PCR ya que los cultivos de sangre han demostrado exponer resultados adecuados sin probable probabilidad de detección de la enfermedad, por ello se recomienda seguir utilizando los protocolos estandarizados según las normativas de recogida de muestra descritos anteriormente en el trabajo de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tuemmers C, Luders C, Rojas C, Serri M, Espinoza R, Castillo C. Prevalencia de leptospirosis en perros vagos capturados en la ciudad de Temuco. *Revista Scielo*. 2013; vol.30(no.3).
2. Campos Chacon N. *Leptospira*. *Revista Scielo* vol.31. 2014.
3. Abgueuen P, Pichard E. *Leptospirosis*. *Revista Elsevier*. 2014.
4. Laplume H, Sardi F, Samartino L, Vanasco B, Cudos C, Farace MI, et al. *Enfermedades Infecciosas Leptospirosis Guia para el Equipo de Salud Republica Argentina: Dirección de Epidemiología - Ministerio de Salud de la Nación*; 2014.
5. Saldaña Campos J, Escobar Garcia D, Pinillos O, Hernandez Montealegre L. *Leptospirosis. Una revision a la Literatura*. *Revista Navarra Medica*. 2018.
6. MSP. *Gaseta Epidemiologica de Enfermedades Zoonoticas: Leptospirosis*. [Online].; 2021.. Disponible en: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2021/10/Leptospira-SE-38.pdf>.
7. Santos AAN RPsSdFGSFREFCea. Formación de biopelículas de *Leptospira interrogans* en reservorios naturales de *Rattus norvegicus* (rata noruega). *PLoS Negl Trop Dis*. 2021.
8. Garcia Gonzalez R, Reyes Trres A, Basilio Hernandez D, Ramirez Perez M, Rivas Sanchez B. *Leptospirosis; un problema de salud pública*. *Rev Latinoamer*. 2013; Vol. 60(Núm. 1).
9. Sanchez I, Bello W, España K, Leon P, Ortiz O, Osorio R, et al. Identificación de *Leptospira* serovariedad *Icterohaemorrhagiae* en un paciente canino con enfermedad renal en el municipio de Florencia–Caquetá, Colombia: descripción de un caso clínico. *Málaga, España*. 2017; vol. 18(núm. 10).
10. Ospina Pinto C, Rincon Pardo M, Soler Tovar D. Papel de los roedores en la transmisión de *Leptospira* spp. en granjas porcinas. 2017.
11. Aroca G, Accini J, Perez R, Robelo E, Dau H. *Leptospirosis icterica: Síndrome de Weil's Barranquilla, Colombia: Universidad del Norte*; 2004.

12. Borbolla Sala M, Garcia Vanegas L, Cardenas Martinez M, Hernandez T, De la Fuente Gutierrez R, Rodriguez Leon O. Leptospirosis durante la contingencia ambiental por inundación en Tabasco 2008. *Salud en Tabasco*. 2009.
13. Ospina Pinto MC, Hernandez Rodriguez P. Utilidad de las herramientas moleculares para la identificación de *Leptospira* spp. en muestras humanas, animales y ambientales. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2015.
14. Roca Voto S. Epidemiología de la leptospirosis animal en el Perú e identificación de poblaciones humanas en potencial riesgo de infección. Lima, Peru.
15. Cheves Jesus M, otros y. Diagnóstico y manejo de leptospirosis icterohemorrágica: a propósito de un caso. 2021.
16. Torres Torres JM, otros y. Síndrome de Weil, leptospirosis icterica. *Revista Universitaria con proyección científica, académica y social*. 2020.
17. Roman Cardenas A. Identificación molecular de leptospira spp presente en el ganado lechero del canton loja. En. Guayaquil - Ecuador: Universidad de Guayaquil; 2016.
18. Torres Castro M, Hernandez S, Agudelo Flores P, Arroyave Sierra E, Zavala Castro J, Puerto F. Revisión actual de la epidemiología de la leptospirosis. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2015.
19. Martin PL, Arauz MS, Stanchi NO. Diagnóstico de leptospirosis mediante técnicas moleculares. *Revista Analecta Vet*. 2015.
20. Muñoz Zanzi C, Groene , Morawski , Bonner , Costa F, Berthera E, et al. Una revisión sistemática de la literatura sobre los brotes de leptospirosis en todo el mundo, 1970-2012. *Rev Panam Salud Publica*. 2020.
21. Ariza Suarez AC, Berdugo Parra CA. Actualización de Leptospirosis Bovina en Colombia. *Conexion Agropecuaria*. 2017.
22. Burgos Macias D, Perez Ruano M, Bulnes Goicochea C, Zambrano Aguayo M, Sandoval Valencia H, Falconi Flores M, et al. Determinación de la seroprevalencia de *Leptospira* spp. y los principales serovares circulantes en el ganado bovino en la provincia de Manabí, Ecuador. *Revista Scielo*. 2019.
23. Zambrano P, Lazo L, Barragan V, Morales M, Bulnes C, Fimia R, et al. Estado Actual

- y Estrategias futuras en la Epidemiología de la Leptospirosis en el Canton Portoviejo. 2017.
24. Valverde Muñoz G, Calvopiña M, Romero Alvarez D, Vasconez E, Trueba G, Garcia Bereguain MA, et al. Leptospirosis en Ecuador: situación actual y perspectivas futuras. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 2023.
 25. Yaguargos Torres J, Romero Veloz LV, Torres Pantoja JE, Sampedro Martinez L. Situación actual de la vigilancia epidemiológica de la zoonosis en Ecuador periodo. Ministerio del Poder Popular para la Salud. 2021.
 26. Carrion Montalvo K, Montes Zambrano V, Bustillos Huilca R, Pineda Romero J, Quizhpe Criollo C, Luna Herrera J. Estudio epidemiológico de leptospirosis en cobayos en la región interandina del sur del Ecuador. *CEDAMAZ*. 2023; Vol 13(No. 1): p. pp. 25–30.
 27. Grimm , Mitchell M, Thompson D, Maddox C. Seroprevalencia de *Leptospira* spp. en las tortugas de Blanding (*Emydoidea blandingii*) del condado de DuPage, Illinois, EE. UU. *BioOne Digital Library*. 2015.
 28. Grimm , Rivera , Fredebaugh-Siller , Yi Weng , Warner , Maddox , et al. Evidencia De Serovares De *Leptospira* En La Vida Silvestre Y Adn De *Leptospira* En Fuentes De Agua En Un área Natural En El Centro-Este De Illinois, EE.UU. *BioOne Digital Library*. 2020; Vol.56(No.2).
 29. Pedersen K, Whitley PN, Anderson TD, Bevins SN, Pabilonia KL, Virchow DR, et al. Evidencia de leptospirosis en riñones y suero de cerdos salvajes (*Sus scrofa*) en Estados Unidos. *PubMed*. 2016.
 30. Gustavo M. Rodamilans MSFLNPCCFIB. *Leptospira interrogans* en serpientes *Boa constrictor* silvestres de fragmentos de selva tropical periurbana del noreste de Brasil. 2020; 209.
 31. Jazmín Bauso MSSYCMFSALNBVCIP. Presencia de *Leptospira* spp. en poblaciones de *Caiman latirostris* (*Crocodylia*, *Alligatoridae*) en Santa Fe, Argentina. 2020.
 32. Morillo Peñaherrera EE. Incidencia de Leptospirosis en Perros Domesticos de la Ciudadela los Nevados del Canton Latacunga. Latacunga.

33. Verma A, Stevenson B, Adler B. Leptospirosis in horses. Vet Microbiol National Library of Medicine. 2013.
34. Yu-Hsien Liu YHCCMC. Leptospirosis fulminante que se presenta con insuficiencia renal aguda de rápida evolución y falla multiorgánica. Biomedicinas. 2024.
35. Alfaro Mora R. Leptospirosis en Costa Rica. Técnicas diagnósticas y su tratamiento. Rev Enf Emerg. 2017.
36. Emma Boertjes JEByO. Hemorragia pulmonar en la enfermedad de Weil. Informes de casos del BMJ. 2020; 13(1).
37. Zunino E, Pizarro R. Leptospirosis. Revista Scielo: Puesta al día. Rev. Chil. 2007; Vol.(n.3).
38. Cespedes M. Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Emergente. Revista Scielo Peru. 2005; Vol 22(Nº 4).
39. Valverde Latorre FX, Ortega Ramos VY, Yunga Quimi AX, Zamora Rodriguez AR. Incidencia, prevalencia e identificación de factores de riesgo asociados a la infección por leptospira. Revista Científica: Dominio de las Ciencias. 2021; Vol. 7(núm. 4).
40. Capriles S. Leptospirosis: Vigilancia de Casos del Programa Síndrome Febril Icterohemorrágico. Revista Scielo. 2017; Vol. 15.
41. Cardona MN, Moros RM, Lopez EA, Perez JL, Hernandez RC. Diagnóstico de leptospirosis mediante la PCR en pacientes con síndrome febril icterohemorrágico. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 2008; v.28(n.1).
42. Sandoval Petris E, Aviles Acosta M, Montesinos Cisneros R, Montalvo Corral M, Tejeda Masir A. A comparative study of the diagnosis of leptospirosis by PCR and MAT in northwestern Mexico. Revista Scielo. 2018; vol.28.
43. Chamaidan Ramon E, Loaiza Guzman M. Estudio de caso de Leptospirosis en Machala en Paciente de 13 años de edad. Machala, Ecuador.
44. Carranza Zamora AJ, Chang Fonseca D, Gutierrez Lopez Y. Leptospirosis y enfermedad de Weil. Revista Médica Sinergia. 2020; Vol. 5(Num. 3).
45. Rojas Jaimes J, Parrales Donayre R, Quispe Anquise I. Cuadro icterico hemorrágico grave causado por *Leptospira interrogans* serovar *Icterohaemorrhagiae*. CES Medicina.

- 2015.
46. Hernandez Cabezas M, Mauri Perez L, Vargas Izquierdo J. Leptospirosis humana: un abordaje epidemiológico desde los factores ambientales. *Rev Cubana Medica General*. 2017; vol 33(nº.1).
 47. Yaguargos Torres JL, Romero Velóz LV, Torres Pantoja JE, Sampedro Martinez JL. Situación actual de la vigilancia epidemiológica de la zoonosis en Ecuador periodo Guayaquil; 2020.
 48. Solon AO, Perez, Andrea , Sanchez , de la Cruz , Rugel. High seroprevalence of anti-*Leptospira* spp. antibodies in domestic and wildmammals from a mixed use rescue center in Ecuador: Lessons for “On Health” based conservation strategies Guayaquil; 2020.
 49. Pérez Ruano , Burgos Macías DI, l Bulnes Goicochea CA, Zambrano Aguayo MD, Patricio Sandoval. Seroprevalencia y factores de riesgo de leptospirosis bovina en la provincia de Manabí, Ecuador Manabi; 2020.
 50. Vitonera Rogel RA, Ayora Muñoz JL. Prevalencia y factores de riesgo de leptospirosis canina en una población de la provincia de El Oro El Oro; 2024.
 51. González Soler JB, Manzano Serrano , Manzano Serrano PA. Terapia de reemplazo renal continua. Presentación de un caso. *Scielo*. 2021; 43(6).
 52. Aranzazu Ceballos AD, Apraez Henao , Ortiz Marín DC. Leptospirosis en pediatría, un diagnóstico a tener en cuenta. *Scielo*. 2020; 36(20).
 53. Clara Arias Monsalve , Alejandro Builes Jaramillo. Builes-Jaramillo A, Arias-Monsalve CS. Impact of El Niño-Southern oscillation on human. ; 13(2).
 54. Natalia Vasylieva , Mykhailo Andreychyn , Yulia Kravchuk , Elena Chervinska , Iaryna Iosy. Cambios en la etiología de la leptospirosis en animales y humanos. 2017; 24(4).
 55. Ordóñez Álvarez LY, Humbelina Díaz A, Blanco Rodríguez JE, Morejón Gómez. Diagnostic and therapeutic algorithm for suspected human leptospirosis in Primary Health Care. 2022; 1(2).

ANEXOS



Foto 1: Recolección de aguas residuales



Foto 2: Rotulación de tubos eppendorf para colocación de muestras



*Foto 3: Sacrificio de roedores:
Extracción de sangre*



Foto 4: Incisión al animal desde la sínfisis pubiana hasta el cartílago xifoides



Foto 5: Colocación de muestras en tubo eppendorf de 1,5 ml

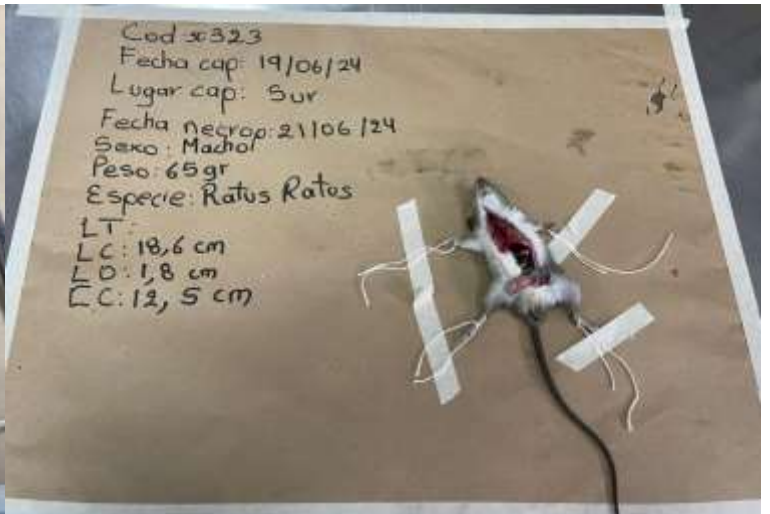
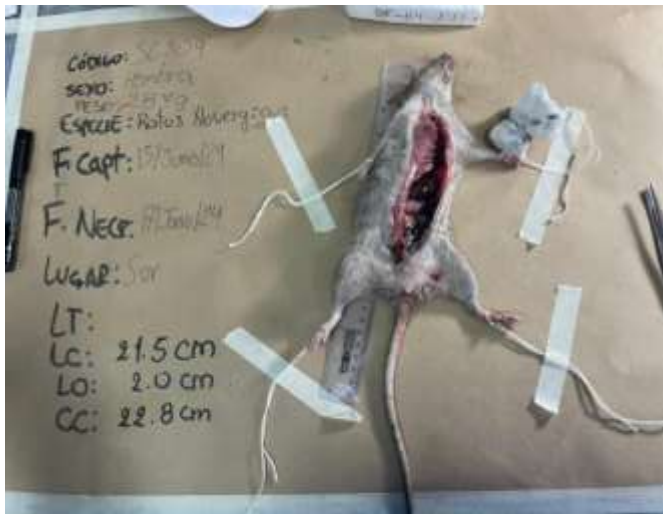


Foto 6: Registro de cada roedor sacrificado



Foto 7: Descongelamiento de las muestras de riñón y sangre



Foto 8: Kit para la extracción de ADN en sangre (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific)



Foto 9: Kit para la extracción de ADN en riñón (Wizard SV Genomic DNA Purification System)



*Foto 10: Kit para la extracción de ADN en agua
(GeneJET Genomic DNA Purification kit)*



*Foto 11: Trabajo en cabina, para la extracción de
ADN y aguas con sus respectivos kits*



Foto 12: Colocación de muestras en centrifuga



Foto 12: Pruebas de agua en termociclador



Foto 13: Pesaje de porción de riñon en microgramera hasta obtener 20mg

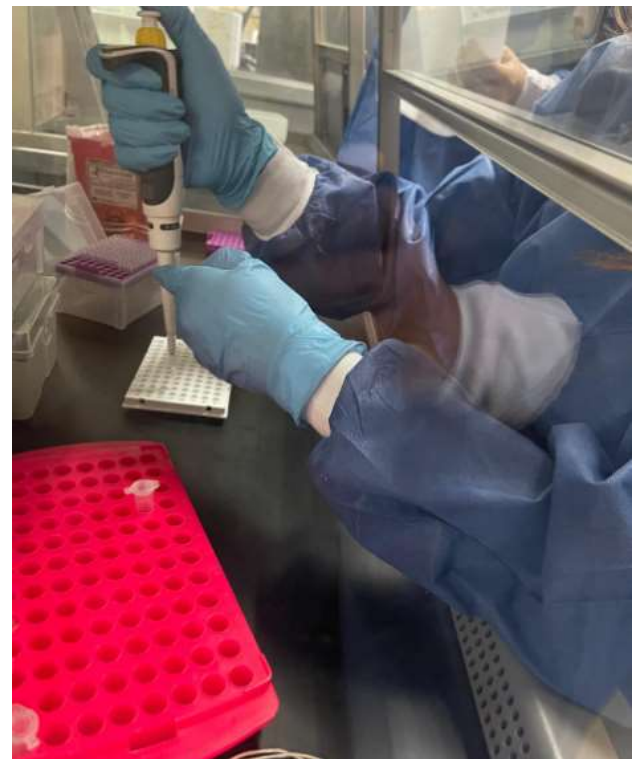


Foto 14: colocación de muestras en cada posillo



Foto 15: colocación de muestras finalizadas en Light Cycler por 2 horas



Foto 16: Foto final, con el Dr. Alberto Orlando y estudiantes de la Universidad Técnica de Manabí