



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LEPTOSPIRA
ICTEROHEMORRÁGICA EN ROEDORES Y AGUAS RESIDUALES DEL
SECTOR NORTE DEL CANTÓN MACHALA.**

**SOLANO GUAMAN GABRIELA ESTEFANIA
MEDICA VETERINARIA**

**MACHALA
2024**



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LEPTOSPIRA
ICTEROHEMORRÁGICA EN ROEDORES Y AGUAS
RESIDUALES DEL SECTOR NORTE DEL CANTÓN MACHALA.**

**SOLANO GUAMAN GABRIELA 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 DEL SECTOR NORTE DEL CANTÓN MACHALA.**

**SOLANO GUAMAN GABRIELA ESTEFANIA
MEDICA VETERINARIA**

VARGAS GONZALEZ OLIVERIO NAPOLEON

**MACHALA
2024**

Leptospira en roedores y aguas residuales sector norte de Machala.

por Gabriela Solano Guamán

Fecha de entrega: 15-ago-2024 08:39a.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2432443746

Nombre del archivo: ira_en_roedores_y_aguas_reciduales_sector_norte_de_Machala..docx (2.24M)

Total de palabras: 13037

Total de caracteres: 69820

Leptospira en roedores y aguas residuales sector norte de Machala.

INFORME DE ORIGINALIDAD

0%

INDICE DE SIMILITUD

0%

FUENTES DE INTERNET

0%

PUBLICACIONES

0%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

ENCONTRAR COINCIDENCIAS CON TODAS LAS FUENTES (SOLO SE IMPRIMIRÁ LA FUENTE SELECCIONADA)

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias

Apagado

Excluir bibliografía

Activo

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

La que suscribe, SOLANO GUAMAN GABRIELA ESTEFANIA, en calidad de autora del siguiente trabajo escrito titulado IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LEPTOSPIRA ICTEROHEMORRÁGICA EN ROEDORES Y AGUAS RESIDUALES DEL SECTOR NORTE DEL CANTÓN 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.



Solano Gabriela

SOLANO GUAMAN GABRIELA ESTEFANIA

0706014214

UNIVERSITAS
MAGISTRO-
RUM
ET SCHOLARIUM

DEDICATORIA

Le dedico el resultado de este trabajo a toda mi familia. Principalmente, a mis padres que me apoyaron y contuvieron los momentos malos y buenos. Gracias por enseñarme a afrontar las dificultades sin perder la cabeza y morir en el intento. Me han enseñado a ser la persona que soy en el presente y sé que lo seguiré siendo en el futuro, todos estos méritos abarcan mis principios, valores, perseverancia y mi empeño.

También quiero dedicar este trabajo a mi esposo Vinicio. Por su paciencia, comprensión, sacrificios, y por su amor que día a día lo reflejo. Jamás voy a dejar de ser una persona agradecida, gracias a ti y a tu perseverancia estoy escribiendo un trabajo de muchos años y de una meta que estoy por alcanzar. Gracias, por tanto.

En honor a mi hermano Enrique, quien desde el cielo me inspira y es una fuente de paz. Aunque ya no estés físicamente conmigo, su espíritu y amor continúan guiándome en cada paso de este largo camino.

Por último y no menos importante dedico este trabajo que con mucho esfuerzo y dedicación, hubo momentos en los que a mis pequeños caninos tuve que quitarles un poco de atención por emplear más tiempo a este trabajo. Mis pequeños enanos los amo mucho hasta la eternidad: Sasha, Layka, Max, Vaca, Salchis, Iris y Hamster

AGRADECIMIENTO

Al culminar esta etapa, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han acompañado y apoyado a lo largo de este viaje.

En primer lugar, agradezco a Dios por darme vida y salud para poder seguir mi día a día con su bendición, agradezco a mis directores de tesis, Dr. Oliverio Vargas, Dr. Lenin Aguilar y al Ing. Irán Rodríguez, por invaluable orientación, paciencia y compromiso en cada etapa de este trabajo. Sus conocimientos y consejos fueron fundamentales para la realización de esta investigación.

De igual manera extiendo mi agradecimiento al Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación "INSPI" por brindarnos todo su apoyo durante este arduo trabajo, al Dr. Alberto Orlando, por siempre estar presto ayudarnos durante estos meses. Y ser un grandioso profesional.

A la institución la Universidad Técnica de Machala, por abrirme las puertas para cumplir mi sueño de ser una profesional en Medicina veterinaria, a mis profesores que, con su dedicación y enseñanza, contribuyeron significativamente a mi formación académica. Cada clase, discusión y debate fue una fuente de inspiración para continuar avanzando.

A mi familia, por su amor incondicional y por ser mi mayor fuente de fortaleza. Gracias por creer en mí y por brindarme el apoyo emocional necesario para enfrentar cada desafío.

Finalmente, dedico este trabajo a todas aquellas personas que, de una manera u otra, han dejado una huella en mi vida durante estos años. Sin su influencia y apoyo, este logro no habría sido posible.

RESUMEN

Introducción: A nivel mundial se detecta más de 1 millón de casos graves al año de Leptospirosis (1). En el Ecuador, la falta de controles sanitarios del sistema de salud pública incrementa la presencia de la bacteria en la población animal y humana, provocándoles síntomas y en muchos casos la muerte.

Objetivo: Determinar la incidencia de *Leptospira icterohemorrágica* en roedores y aguas residuales en el sector norte de la ciudad de Machala mediante la técnica de laboratorio PCR.

Metodología: El presente trabajo, se lo ejecutó en la provincia del Oro, en la zona norte de la ciudad de Machala, es un estudio de tipo transversal de carácter cuantitativo y cualitativo, primero porque se lo ejecuto en un periodo corto de tiempo, procediendo con la recogida de muestra para identificar la presencia de *Leptospira* y segundo porque en base a la obtención de los datos se logró evidenciar porcentajes y el análisis correspondiente.

Resultados: Se determina que según la aplicación de análisis de PCR y aguas residuales se obtuvieron resultados significantes ya que se evidenció un 60% que corresponde a contaminación de aguas contaminadas por Leptospirosis y un 40% de negatividad de la bacteria *Leptospira*.

Conclusiones: Resultó importante la intervención que se realizó ya que se evidenció que las aguas residuales fueron el principal factor para que esta zoonosis se encuentre persistente, por ello seguir con la sensibilización de la población en estrategias de salud de higiene y limpieza, de bioseguridad con la finalidad de controlar y prevenir esta patología.

Palabras clave: Leptospirosis, zoonosis, roedores, saneamiento, estrategias de prevención.

ABSTRACT

Introduction: Globally, more than 1 million severe cases of leptospirosis are detected each year (1). In Ecuador, the lack of sanitary controls within the public health system increases the presence of the bacteria in both animal and human populations, leading to symptoms and, in many cases, death.

Objective: To determine the incidence of *Leptospira icterohaemorrhagiae* in rodents and wastewater in the northern sector of the city of Machala through the PCR laboratory technique.

Methodology: This study was conducted in the province of El Oro, in the northern zone of the city of Machala. It is a cross-sectional study with both quantitative and qualitative characteristics: quantitative, because it was carried out over a short period of time, involving sample collection to identify the presence of *Leptospira*; and qualitative, because the data obtained allowed the identification of percentages and corresponding analysis.

Results: The results determined through the application of PCR analysis and wastewater testing were significant, as 60% of the results indicated contamination by leptospirosis, while 40% were negative for *Leptospira* bacteria.

Conclusions: The intervention proved to be important, as it was shown that wastewater was the main factor in the persistence of this zoonosis. Therefore, continuing to raise awareness in the population about hygiene, cleanliness, and biosecurity strategies is crucial to control and prevent this disease.

Keywords: Leptospirosis, zoonosis, rodents, sanitation, prevention strategies.

ÍNDICE

CAPÍTULO I	10
I.Introducción	10
1.1. PROBLEMÁTICA	11
1.2. JUSTIFICACIÓN	12
1.3. Antecedentes	13
1.4. Leptospirosis	13
1.4.1. Agente etiológico.....	14
1.4.2. Clasificación de Leptospiras.....	14
1.5. Epidemiología	15
1.6. Fisiopatología.....	16
1.7. Manifestaciones clínicas	17
1.7.1. Leptospirosis anictérica	17
1.7.2. Leptospirosis icterohemorrágica.....	18
1.8. Reservorios naturales	18
1.9. Hospederos accidentales	18
1.10. Leptospirosis en otras especies	19
1.11. Leptospirosis en humanos.....	20
1.12. Reservorios en ambiente	20
1.13. Transmisión.....	20
1.14. Factores de riesgo que influyen en la incidencia de la enfermedad.....	21
1.14.1. Grupos de Riesgo.....	21
1.15. Diagnóstico diferencial	21
1.16. Técnicas de diagnóstico	22
1.16.1. Microaglutinación con antígenos vivos (MAT).....	22
1.16.2. Hemoaglutinación Pasiva (HAT).....	22
1.16.3. Aglutinación de látex (LAT).....	23

1.16.4. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	23
1.16.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	23
1.17. Medidas de control.....	23
1.17.1. Eliminación del reservorio de leptospirosis.....	23
1.17.2. Evitar la contaminación de los medios referidos.....	24
1.17.3. Evitar el contagio humano con los medios contaminados.....	24
1.17.4. Quimioprofilaxis de los casos con riesgo temporal.....	24
1.18. PREVENCIÓN	24
1.19. Tratamiento	25
1.20. Aguas residuales	25
1.20.1. Muestreo de agua residual	26
1.20.2. Planificación y Programación del Muestreo.....	26
1.20.3. Toma de muestras – Control y Vigilancia.....	26
1.21. OBJETIVOS	28
1.21.1. Objetivo general	28
1.21.2. Objetivos específicos.....	28
CAPÍTULO II.....	29
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
2.1. Tipo de estudio.....	29
2.2. Paradigma.	29
2.3. Localización de estudio.....	29
2.3.1. Ubicación geográfica y política.....	29
2.3.2. Ubicación.....	30
2.4. Población.....	30
2.5. Muestra.....	30
2.6. Variables.....	31
2.6.1. Variables de estudio	31

2.7.	Equipos y Materiales.....	31
2.7.1.	De protección personal.	31
2.7.2.	Materiales para realizar la necropsia	31
2.7.3.	Materiales de recolección de muestras	32
2.7.4.	Materiales para extracción de ADN. (kit para Sangre: Invitrogen by Thermo Fisher Scientific).....	32
2.7.5.	Materiales del Kit para riñón: (Wizard SV Genomic DNA Purification System) 32	
2.7.6.	Materiales del kit de agua. (GeneJET Genomic DNA Purification kit) ...	32
2.7.7.	Otros materiales.....	32
2.7.8.	Materiales de registro	33
2.7.9.	Materiales para el descarte del roedor.	33
2.8.	PROCEDIMIENTO PREVIO A LA NECROPSIA.....	33
2.8.1.	Para el equipamiento del personal:.....	33
2.8.2.	Para la limpieza del mesón:	33
2.8.3.	Preparación del material a utilizar:	33
2.8.4.	Para el sacrificio del animal:	34
2.8.5.	Para la toma de muestra de sangre:	34
2.8.6.	Para la disección del animal:	35
2.8.7.	Para la toma de muestras de la cavidad torácica:	35
2.8.8.	Para la toma de muestras de la cavidad abdominal:	35
2.8.9.	Para el registro de datos del animal:	35
2.8.10.	Para el almacenamiento de muestras colectadas	36
2.8.11.	Para el descarte del animal:	36
2.9.	Protocolo para extracción de ADN	36
2.9.1.	Procedimiento para la extracción de ADN de tejido - riñón.....	36
2.9.2.	Procedimiento para la extracción de ADN de Sangre	37
2.9.3.	Procedimiento para la extracción de ADN de Aguas	39

2.10. PROCEDIMIENTO PARA LA PRUEBA qPCR.....	40
2.10.1. Preparación del Máster Mix:	41
CAPÍTULO III	44
III. RESULTADOS	44
3.1. Elaboración de mapa epidemiológico a partir de la identificación de la presencia o ausencia de <i>leptospira icterohemorrhagica</i> en el sector norte	44
3.2. Tabla de tabulación de datos	45
3.3. Tabla por asociación Chi cuadrado.	46
3.4. DISCUSIÓN	47
CAPÍTULO IV	51
IV. CONCLUSIÓN.....	51
CAPITULO V.....	52
V. RECOMENDACIONES.....	52
BIBLIOGRAFÍA	53

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Especies del género <i>Leptospira</i>	15
Tabla 2 Huéspedes domésticos accidentales.....	19
Tabla 3. Secuencia de primers para identificación de <i>Leptospira</i>	41
Tabla 4. Reactivos para la preparación del Máster Mix en las amplificaciones por qPCR para leptospira.....	42
Tabla 5. Programa del termociclador para las reacciones por PCR dirigidas a <i>Leptospira</i>	43
Tabla 6. Prevalencia o presencia de leptospira en ratas y aguas residuales	46
Tabla 7 Resultados de la prueba Chi-Cuadrado por asociación de contagio de <i>Leptospira</i>	47

CAPÍTULO I

I. Introducción

La leptospirosis tiene una amplia distribución mundial, producto de lo cual se detecta más de 1 millón de casos graves al año (1), se encuentra presente en países como África, Asia, Brasil y Colombia, Latinoamérica y el Caribe. El Ecuador al ser a un país en vías de desarrollo tiene muchas posibilidades de encontrar *Leptospira* en lugares húmedos especialmente en época de lluvias, además, la falta de controles sanitarios por parte del sistema de salud pública en el agua potable y aguas residuales puede incrementar la presencia de la bacteria en la población animal y humana, provocándoles síntomas leves y graves que en muchos casos se produce incluso la muerte.

El presente trabajo tiene como propósito investigar la incidencia de *Leptospira icterohemorrágica* para ayudar a los diferentes ministerios como de la salud pública, medio ambiente y a su vez agrocalidad para así se tener control de las enfermedades transmitidas por los roedores a los seres humanos y animales ya sea la transmisión por mordedura o por contaminación del agua o alimentos.

Para determinar la presencia de *Leptospira* en roedores y agua en el sector norte de Machala se necesitara de la utilización de la técnica de laboratorio clínico PCR con el cual se brindara a la sociedad indicios de la presencia de la bacteria para que la población junto con otros sistemas de control sanitario tomen medidas necesarias ya sean preventivas, para controlar o erradicar la problemática, además, mediante la búsqueda de artículos científicos actuales sobre *Leptospira icterohemorrágica* podemos relacionar como influyen los roedores en la adquisición de la enfermedad en la ciudad.

1.1. PROBLEMÁTICA

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica que se transmite a personas, animales e incluso al medio ambiente por medio de roedores, agua o suelos contaminados por el agente etiológico *Leptospira*, el cual en todo el mundo se han documentado casos graves de leptospirosis con una presentación de la enfermedad de 0,1 a 1 caso por cada 100.000 personas en climas templados y de 10 a 100 casos por cada 100.000 habitantes en climas tropicales (2).

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) ha estimado 10.702 casos de leptospirosis anualmente en la región, de los cuales el 7,2% son de Ecuador, la cuarta prevalencia más alta después de Brasil, Perú y Colombia, mientras el Ministerio ecuatoriano de Salud estimó una incidencia anual de un caso por cada 100.000 personas a nivel nacional, con 547 casos notificados entre 2016 y 2020, principalmente en las provincias costeras (3). Estos valores en nuestro país se deben a la falta de controles sanitarios en sectores marginales y urbanos ya que los brotes ocurren en zonas propensas a tener inundaciones y aguas contaminadas con la orina de animales contagiados. Por estas razones se hace necesario el estudio de la incidencia de *Leptospira icterohemorrágica* en la ciudad de Machala como aporte para el control y supervisión de Leptospirosis en roedores y aguas residuales debido a que esta patología puede aumentar durante periodos de lluvias intensos como lo es el fenómeno de El niño.

1.2. JUSTIFICACIÓN

La Leptospirosis es una patología de interés mundial debido a que desde su aparición sus valores de incidencia han ido incrementando hasta la actualidad, ya que las personas la pueden contraer a través de diferentes factores importantes como las condiciones ambientales, el contacto con los animales, aguas residuales y el estatus socio económico(4). Existen enfermedades infecciosas como influenza, hepatitis, dengue, infecciones por hantavirus u otras fiebres hemorrágicas virales, fiebre amarilla, malaria, brucelosis, borreliosis, fiebre tifoidea que dificultan el diagnóstico diferencial de la Leptospirosis y hace que la enfermedad siga evolucionando lo que puede llevar a la muerte del paciente(5).

Nuestro país Ecuador tiene pocos establecimientos de tratamiento de aguas residuales ya que solo el 62% de los 215 municipios del país trata el agua residual y los demás no realiza nada al respecto, por lo que estas aguas pueden contaminar playas, ríos, productos agrícolas y pesqueros que se cultivan en zonas aledañas, lo que aumenta un riesgo para la salud(6). Por ello es sumamente importante conocer la incidencia actual de *Leptospira* en Machala, para que con la información obtenida se pueda hacer un buen control de plagas como lo son las ratas, el control rutinario de nuestros animales domésticos y el adecuado procesamiento de aguas residuales para no incrementar el número de personas con leptospirosis.

1.3. Antecedentes

Las primeras referencias documentadas de la Leptospirosis se remontan a eventos históricos como la invasión napoleónica a Egipto y del enfrentamiento americano. El doctor Francisco Navarro y Valdes en 1886 al tener la intuición de leptospirosis, incluyeron unas referencias iniciales en su trabajo de tesis doctoral “La fiebre biliosa de los climas cálidos no es fiebre amarilla”, sino más bien una afección icterohemorrágica que su principal sintomatología era la fiebre, la cual afectaba a las personas que vivían en zonas pantanosas que se manifestaba en determinados periodos de año. En 1883, Luis Landouzy fue el precursor en identificar a la leptospirosis en los humanos, como un organismo climático de diferentes entidades; A los tres años después, Adolf Weil analizó los síntomas relevantes que estaban presentando las personas que se dedicaban a la agricultura en Alemania, temperaturas elevadas, coloración amarillenta de la piel, sangrados abundantes, problemas hepáticos y a nivel renal. En 1888, se denominó a la Leptospirosis como Enfermedad de Weil en su honor a este destacado investigador, el mismo que calificó a esta enfermedad grave con elevado grado de letalidad. (7).

Hideyo Noguchi en 1917, logró separar el agente responsable causal en su entorno y propuso que se denominara como leptospirosis a este género. En ese mismo año, Ido y su equipo de trabajo observaron este microorganismo en el sistema renal de los roedores y seguidamente varios investigadores del tema revelaron los descubrimientos de los distintos “serogrupos y serovares”. En Japón en el año 1919 se realizó un primer aislamiento en un paciente que presentó como síntomas ictericia y sangrados, se nombró a la enfermedad como *icteroheemorrhagiae*(7).

1.4. Leptospirosis

Es una enfermedad zoonótica, provocada por “espiroquetas” ocasionadas por las bacterias del género *Leptospira*, la cual es muy usual en regiones tropicales. Es una patología que es conocida con diversos nombres según la ubicación y lugar donde esta ha sido investigada, siendo algunos los más peculiares: “enfermedad de Weil, enfermedad de Swineherd, enfermedad transmitida por aguas, fiebre de los campos de arroz”, etc. El contagio se produce por entrar en contacto directo e indirecto con un animal portador, el mismo que lleva los microorganismos en su sistema renal para luego ser expulsado en la micción. Aunque varios animales salvajes logran también ser huéspedes de la enfermedad. El huésped más relevante son las ratas cafés (*Rattus norvegicus*) es la

principal fuente de contagio para el ser humano. La fuente de infección humana más importante (8)

El tiempo para su desarrollo abarca desde dos hasta 30 días y se manifiesta con una extensa gama de síntomas clínicos, los cuales van de la forma más mínima hasta la variante más letal así es la enfermedad icterohemorrágica o como también se la conoce enfermedad de Weil(9).

1.4.1. Agente etiológico

Las Leptospiras son bacterias estrictamente aerobias con enzimas como oxidasa, catalasa y peroxidasa, su forma helicoidal, enrollada en direcciones a las manecillas s del reloj con una pequeña curva en uno de sus lados, es característica de la leptospira patógena. Su movilidad es impulsada por fibrillas axiales en una protuberancia al final del cuerpo citoplasmático, varía según el medio de cultivo. Con un diámetro de 0.25 μm aproximadamente y longitud de 6-25 μm . Estas bacterias conservan su infectividad en suelos, agua, vísceras, leche, pantanos, ríos. Se destaca que la orina antiséptica, acida y desinfectante impide la supervivencia, es muy sensible a antibióticos entre estos incluye a la penicilina(10)

El tiempo de supervivencia en el suelo y agua de estas bacterias va a variar según las temperaturas, el grado de contaminación, pH, y la salinidad. La radiación ultravioleta las inactiva deshidratación, resisten bajas temperaturas. Su duplicación óptima ocurre a un pH de 7.2 a 7.4 y se rompen ambientes ácidos o alcalinos con pH superiores a 8. En condiciones fisicoquímicas adecuadas, pueden persistir semanas en agua dulce(11).

1.4.2. Clasificación de Leptospiras

La familia Leptospiraceae comprende 3 géneros: *Leptospira*, *Turniella* y *Leptonema*. Dentro del género, se identifican un total de 23 especies, de las cuales 10 patógenas, 6 su patogenicidad no es clara y 7 no son consideradas patógenas. (Tabla 1)(8).

Tabla 1 Especies del género *Leptospira*

Patógenas	Patogenicidad no clara	No patógenas
<i>L. alexanderi</i>	<i>L. broomii</i>	<i>L. biflexa</i>
<i>L. alatonii</i>	<i>L. inadai</i>	<i>L. idoni</i>
<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. fanei</i>	<i>L. meyeri</i>
<i>L. interrogans</i>	<i>L. licerasiae</i>	<i>L. terpstrae</i>
<i>L. kirschneri</i>	<i>L. venezuelansis</i>	<i>L. yanagawae</i>
<i>L. kmetyi</i>	<i>L. wolffii</i>	<i>L. vanthielii</i>
<i>L. mayottensis</i>		<i>L. wolbachi</i>
<i>L. noguchii</i>		
<i>L. santarosai</i>		
<i>L. weilii</i>		

Fuente: (8).

1.5. Epidemiología

La leptospira se destaca como una de las zoonosis más conocida a nivel mundial y, específicamente en las Américas, se cataloga como una enfermedad reemergente; esta clasificación surge debido a la manifestación de numerosos brotes epidémicos asociados a diversas serovariantes de leptospiras, afectando de manera significativa a naciones ubicadas en regiones tropicales y subtropicales. Entre los países afectados se encuentran Nicaragua, Brasil, India, y los del sudeste asiático y los Estados Unidos.(12).

En Ecuador, la incidencia de leptospirosis (*Leptospira spp.*) Ha experimentado un incremento notable en los últimos años. En 1998 fueron notificados 398 caso, “El Niño” (Oscilación del Sur) que se manifestó en ese mismo año, caracterizado por un aumento correspondiente en ese mismo año, caracterizado por un aumento correspondiente en la presencia de agua estancada y la temperatura. En ese mismo año los casos se mantuvieron relativamente bajos a excepción de los años 2011 y 2012, fueron reportados 376 y 1,279 casos, fue relacionado a un fenómeno opuesto “La Niña” (Oscilación del Norte). En el año 2012 se identificó que la fuente del brote en las regiones de los Ríos y Guayas (Región costera) estaba asociada al consumo de aguas provenientes de estanques fijos contaminados con desechos fecales, mientras que en el 2011 se atribuyó al contacto con agua contaminada con materia fecal de ratas. En el 2013, fueron notificados 894 casos, pero aun así se observó una ligera disminución en las tasas de infección. En 2005, se

registró un baja tasa de contagios, mientras que, en el 2006, pasaron hacer 56 a 122 casos. Entre 2006 y 2010, las cifras experimentaron un crecimiento gradual hasta alcanzar los 376 casos. Sin embargo, en 2011, el número de casos notificados se triplicó, llegando a 1.279 evidencias(13).

En el año 2018, se han documentado 139 casos de leptospirosis en Ecuador, y se destaca que en la provincia con mayor incidencia es Manabí, registrando 28 casos, lo que equivale al 20,14 % del total, según datos proporcionados por el Ministerio de salud Pública(14).

En Ecuador, la leptospirosis ha sido objeto de seguimiento por parte del Ministerio de Salud Pública (MSP), que ha estimado una medida anual de 1 caso por cada 100.000 habitantes. Entre el 2016 al 2018 se confirmaron 363 casos, siendo las provincias costeras (Manabí, Esmeraldas y los Ríos), las que presentaron un mayor predominio, alcanzando un porcentaje de 43% de provincias afectadas. En cuanto a la evaluación anual, se observa una disminución en los casos notificados a partir del año 2019, donde se registraron 137 casos, en el 2020 con 75 casos reportados, y en el 2021 con 69 casos a nivel nacional. En la SE 2 del 2022 se notificó 1 caso de leptospira a nivel nacional(15).

1.6. Fisiopatología

Cuando sucede una infección los microorganismos acceden al sistema circulatorio una vez dada la infección en los órganos es donde se realiza la proliferación y la afectación: para que se complete el ciclo de vida de la leptospira es cuando pasan el intersticio y túbulo proximal del riñón. Por ciertos movimientos de excavación, secreciones de enzimas incluidas la colagenasa y la esfingomielinasa, ayudando a la leptospira a ingresar a los tejidos. Existe una interacción directa de las proteínas y los componentes de matriz extracelular del hospedador, como el colágeno, la fibronectina y la laminina (11).

Otros componentes adicionales que contribuyen a la adhesión del huésped son las proteínas semejantes a la inmunoglobulina Lig A y B. Además de las proteínas de la membrana, la leptospira contiene una gran carga de enzimas invasivas como colágenas y metaloproteínas que pueden rápidamente invadir el sistema sanguíneo extendiéndose a todos los órganos blandos y eliminación en la orina (8).

Las espiroquetas disponen de una disminución de endotoxinas, la respuesta inmunitaria innata se activa cuando a través de una señal de un receptor de tipo Toll 2 y

se opina que genera una respuesta de citosina; los complejos inmunitarios circulan transportando la afectación renal y la disfunción endotelial (11).

La característica fundamental de una leptospira grave fisiológicamente severa es el cumulo de citoquinas, determinando una respuesta inflamatoria que se presenta en estos casos, las principales citoquinas relacionadas son IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 y TNF; α , resumiendo en diferentes respuestas metódicas durante la leptospira. En la respuesta adaptiva inmune se ha caracterizado por la depuración de la leptospirosis en sangre y un aumento de anticuerpos. Durante la enfermedad en su fase febril e inmune se origina un daño de gran importancia en los tejidos que resulta en una afectación persistente de varios órganos. Existen 3 órganos principales que son afectados por la leptospira humana, de los cuales el primero es el hígado, que se manifiesta con congestión sinusoidal, apoptosis de las células hepáticas y se pueden observar hemorragias y en la superficie petequias del tejido pulmonar, también en los riñones se han descrito insuficiencia renal o lesiones renales agudas graves y marcado el síndrome de Weil, adicionando a esto una necrosis tubular con dilatación de la luz tubular (8).

1.7. Manifestaciones clínicas

La sintomatología es variable y presentan diversos grados de gravedad existen numerosos casos llamativos cuando la leptospira es endémica la de las infecciones son asintomáticas o no es muy fácil de diagnosticar ya que son leves para dar un diagnóstico definitivo. Probablemente causa infecciones agudas, subagudas y crónicas, generalmente pueden dividirse en dos casos clínicos la ictericia y no ictericia (5).

La enfermedad febril comienza con síntomas inespecíficos como vómitos, escalofríos, conjuntivitis que duran máximo de cinco a diez días, después de los signos clínicos que no son claros manifestando una de las dos formas de exposición de esta enfermedad (16).

1.7.1. Leptospirosis anictérica

A lo largo de este tiempo existe una fase febril elevada de 39-40°C, con cefalea retroorbitaria, mialgia local ocasionadas, síntomas estomacales con vómitos, diarreas y síntomas del sistema respiratorio(16).

En el aspecto clínico tienen una representación del 90% de casos, el diagnóstico físico se halló una hiperemia conjuntival, no tiene relación pulso con temperatura existe hepatomegalia siendo más raro la esplenomegalia (5).

1.7.2. Leptospirosis icterohemorrágica

La incidencia de la ictericia es del 10% con un inicio idéntica a la anictérica, en el quinto día se manifiesta la ictericia, IRA, las hemorragias, anemia, afecta a la conciencia, al miocardio. La esplenomegalia y la hepatomegalia, pero la menos frecuente es la pancreatitis. En la forma grave puede llegar a presentarse la pericarditis, hemolisis, el shock séptico y el fallo de varios órganos. La forma icterica más constante es el comportamiento monofásico, ya que las manifestaciones sépticas se funcionan con manifestaciones inmunes (5).

La leptospira se asemeja con otras enfermedades a causa de las manifestaciones proteicas, por ejemplo, con el dengue, la fiebre amarilla, la malaria, la influenza, etc. y asociado con otras enfermedades abortivas como la DVB, la brucella en bovinos, la IBR y el circovirus en porcinos. Por ende, se tiene un mal diagnostico ya que se llega a confundir la sintomatología clínica con estas enfermedades (17).

1.8. Reservorios naturales

Hay muchos animales diversos incluidos en el ciclo de la transmisión de la leptospira, de cierto modo hay animales que son más importantes como los del reservorio natural que se conforma de pequeños animales sinantropicos que pertenecen a los roedores debido a que sostienen una asociación comensal con espiroquetas (infectando de manera placentaria), y perseverando la circulación de serotipos patógenos en determinadas áreas geograficas sin la intervención de un huésped accidental. Los principales de disipar la leptospira son los del género sinantropico *Rattus* y *Mus*, teniendo una importancia a nivel mundial y nacional ya que por la orina eliminan sus bacterias. Se realizaron estudios cuantitativos experimentales de orina en ratas contaminadas que revelaron la concentración de 100 millones en bacterias/ml(10).

La especie que es capturada con mucha frecuencia en ambientes sub-urbanos es la *Rattus norvegicus*, el serotipo de *Icterohaemorrhagiae* es el más común que ha sido aislado, como también se hallado otro serotipo como el *Ballum* (18).

1.9. Hospederos accidentales

Ellos se contaminan por via indirecta por la contaminación ambiental por aquellos con orina a reservas positivas. Es importante recalcar que cualquier animal es capaz a contagio y convertirse a un huésped accidental las especies domesticas son usualmente portadoras (Tabla 2)(10).

Tabla 2 Huéspedes domésticos accidentales

Huéspedes domésticos	Serotipos
Porcinos	Pomona, tarassovi, bratislava, canicola, icterohaemorrhagiae, muenchen, grippotyphosa.
Bovinos	Hardjo, pomona, grippotyphosa.
Equinos	Bratislava, hardjo, pomona, canicola, icterohaemorrhagiae, sejroe.
Caninos	Canicola, pomona, grippotyphosa, icterohaemorrhagiae, pyrogenes, paidjan, tarassovi, ballum, bratislava.
Ovejas-Cabras	Hardjo, pomona, grippotyphosa, ballum.
Felinos	Canicola, icterohaemorrhagiae, copenhageni, munchen, bataviae, Castellonis, mangus, panama, cynopteri, grippotyphosa, pomona.

Fuente: (10)

Es muy importante conocer que la presencia de animales portadores en la transmisión de leptospira se da por muchas fuentes ambientales. Incluso hay reportes de distintos animales salvajes con leptospira como el murciélago, la zarigüeya, el ciervo, la mangosta y algunos insectívoros pequeños (19).

1.10. Leptospirosis en otras especies

En el Ecuador el cuy es un importante sustento alimenticio y por supuesto económico de la población indígena; para la producción de esta especie se emplean tres sistemas de crianza, en un estudio se logró detectar la evidencia de infección por *Leptospira* spp. en el 6,86 % de los cuyes estudiados mediante el análisis de MAT y PCR convencional, siendo este el primer reporte en el país en animales destinados a producción. La frecuencia de infección del 6,86 %, pone en evidencia la susceptibilidad de esta especie a la infección natural por *Leptospira* spp. en áreas de producción para el consumo humano; a la vez que la identificación de los serovares (20).

en EE, UU en el centro oeste de Illinois, se identificó que el 48% de mapaches (*Procyon lotor*) resultaron seropositivos; dieron resultados positivos: doscientos veinte mapaches tuvieron anticuerpos como la *Leptospira interrogans* serotipos Grippotyphosa, y 2 para *Leptospira interrogans* serotipos Icterohemorrhagiae y Canicola (21,22). En el noroeste de Illiones en un ambiente urbano se identificaron los niveles de anticuerpos en

tortugas Blanding (*Emydoidea blandingii*) a la exposición a *Leptospira kirschneri* serotipo Grippytyphosa y *Leptospira interrogans* serotipo Bratislava e Icterohemorrhagiae (22).

Se encontraron en las zarigüeyas anticuerpos de al menos siete serotipos de leptospirosis, el Autumnalis serotipo con mucha más prevalencia de 38,7%, seguido de la Bratislava con un 28,5% y con 21,3% de Grippytyphosa con los serotipos más frecuentes (23).

Los cerdos salvajes son considerados posiblemente los transmisores de leptospira y eso significa un riesgo ya que la población está en crecimiento y en contacto con muchas personas y diferentes animales domésticos, aumentando de manera significativa. Los serotipos fueron hallados, el serovar *Bratislava*, el serovar *Icterohaemorrhagiae* y serovar *Pomona* (24).

1.11. Leptospirosis en humanos

Se conocen más de doscientos veintiseis serotipos de leptospirosis serológicamente y también hay distintos de ellos que son estudiados muy poco. Los serotipos que están involucrados habitualmente en las infecciones humanas son: la icterohaemorrhagiae, la canicola, tarassovi, wolffi, bataviae, hardjo y grippytyphosa, copenhageni, djasiman, panama y patoc (25).

1.12. Reservorios en ambiente

Estadísticamente muchos de los casos humanos se deben a que están expuestos a los ríos y lagos lo que significa que tiene una alta perduración en masas de agua más grandes, sin embargo, estos entornos carecen de evidencia y muy pocas veces se ha hallado leptospirosis. Los bordes de los ríos logran ser como un tipo de reservorio donde se alojan las bacterias de leptospirosis. Se tiene sospecha que es posible que el suelo este contaminado y que sea una causa de transmisión de la leptospirosis ahora últimamente ha recibido mayor atención. Hay condiciones climáticas como cálido-húmedo y la condición del suelo que permiten la contribución a una perduración ambiental más larga. Otros factores que se relacionan con la leptospirosis son las lluvias intensas, pH neutro, la contaminación fecal es de bajo nivel, y humedad alta.(26).

1.13. Transmisión

La *Leptospirosis* se transmite de 2 maneras: por contacto directo a través de la orina infectada, por transmisión placentaria y venérea y la otra manera es por transmisión

indirecta que es cuando tienen fuentes de agua contaminadas, la comida, el suelo y las condiciones ambientales con temperatura de 0°C y 25°C. (27).

1.14. Factores de riesgo que influyen en la incidencia de la enfermedad

Existen factores de amenaza que se relacionan para contraer una infección por *Leptospira spp* se ha investigado en diversas poblaciones, relacionándolo con aspectos sociodemográficos y epidemiológicos. Entre estos factores se encuentran la predisposición asociada por los riesgos laborales como también ocupacionales, como el trabajo en la agricultura, el estar cuidando de animales, la recolección de basura y tener heridas en la piel. Trabajar en cultivos de arroz se ha señalado que es un factor considerable para contraer la *Leptospira*, además tener animales domésticos como perros y gatos y el contacto con los roedores son parte de la contribución de la enfermedad. Las fuentes de agua y las inundaciones que están cerca de las viviendas incrementan la predisposición a la infección por leptospirosis, ya que por la orina de animales infectados y con los suelos contaminados estando en contacto con los humanos especialmente si tienen heridas en la piel (28).

1.14.1. Grupos de Riesgo

Aquellos profesionales, trabajadores y otras ocupaciones en las que realizan trabajos controlando los roedores o que implican contacto con animales. Además, el contacto directo se destaca en los obreros de desagüe, los que se dedican a limpiar tanques sépticos y a los criaderos de peces, etc. (29)

1.15. Diagnóstico diferencial

La *Leptospira* tiene que saber distinguirse de las otras enfermedades febriles que también presentan cefalea y mialgias, como el dengue, paludismo, hepatitis vírica y enfermedades que son causadas por *Rickettsia*. Existen un amplio parecido en la presentación epidemiológica como también clínica de la *Leptospira* y el hantavirus, como también la contaminación por ambas donde se tiene que efectuar las pruebas serológicas para así poder detectar el virus siempre y cuando se sospeche de zonas endémicas de *Leptospira*. Se necesita realizar un plan con diagnóstico diferenciales de otras enfermedades que se asocian a presentar signos clínicos idénticos como: la influenza, la fiebre amarilla, la fiebre tifoidea, la tuberculosis, y brucelosis, etc.(30)

1.16. Técnicas de diagnóstico

Las fundamentales técnicas que se pueden emplear en la leptospirosis incluyen anticuerpos fluorescentes, la técnica de impregnación de plata, la reacción de cadena de polimerasa (PCR) que es cuantitativo en el tiempo real y la prueba serológica de microglutinación. En algunos países utilizan diversos ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), basados en los serotipos dominantes en la región donde se aplicará la prueba. En el tiempo actualmente, el método de oro es la prueba MAT se debe tomar dos muestras seriadas con un intervalo de diez días, comparando la titulación para observar un crecimiento de hasta cuatro veces en los anticuerpos (27).

1.16.1. Microaglutinación con antígenos vivos (MAT)

El inicio de la microaglutinación con antígenos es muy simple ya que se basa en unir el suero a diluir con un cultivo de leptospirosis luego se evalúa el nivel de aglutinación resultante de la inmunorreacción y utilizar el microscopio de campo oscuro (31).

La prueba serológica de MAT es utilizando para la detección de la *Leptospira* humana. No obstante, presenta varios inconvenientes ya que tiene la necesidad de realizar muestras pareadas para hallar la seroconversión en el entorno clínico esto no es muy práctico ya que tarda en dar un diagnóstico además es un procedimiento tedioso y complicado que tiene que involucrar antígenos de leptospirosis vivos y la verificación periódica de la identidad del serotipo para asegurar resultados exactos. Se ha reportado que MAT puede generar resultados falsos positivos ya que los anticuerpos pueden tener una reacción cruzada con enfermedades como la sífilis, la fiebre recurrente, la enfermedad de Lyme, malaria y pueden producir títulos de 1:80 o 1:100. Otra limitación que tiene el MAT es que no puede hacer diferencia de animales infectados y vacunados, ya que no distingue entre anticuerpos que son generados de manera natural y los que son producidos mediante vacunación. Asimismo, el MAT no puede distinguir entre anticuerpos IgM que es un indicador de una actual infección y los anticuerpos IgG indicador de una pasada infección (32).

1.16.2. Hemoaglutinación Pasiva (HAT)

Para detectar anticuerpos de la clase de IgM esta técnica es la ideal. La sustancia sensibilizante de eritrocitos como así es denominada utiliza el antígeno polisacárido que es extraído de una especie *L. biflexa*. Se utilizan los eritrocitos de un carnero los cuales serán sensibilizados mediante el antígeno creando un complejo que identificara y marcara específicos anticuerpos que se presentan en el suero del paciente. El HAT tienen una

sensibilidad del 92% y su especificidad de un 95% este método es eficaz y sencillo de realizarlo (30).

1.16.3. Aglutinación de látex (LAT)

Esta prueba es muy económica y tiene una detección rápida está diseñada para el análisis a gran escala en muestras de suero en zonas endémicas sin emplear algún equipo de alta tecnología. La LAT es utilizada con éxito por los epidemiólogos para la detección de anticuerpos antileptospirales en los humanos, recubriendo perlas de látex con las proteínas recombinantes tales como LipL41, LipL32 y Lsa27 (32).

1.16.4. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

La Elisa es una prueba que facilita la detección de IgM e IgG de preparados de *L. biflexa* o de varias especies infecciosas. Generalmente genera muy rápido los resultados de una a dos horas, presentando una sensibilidad del 90% y con una especificidad del 88-95%. Sin embargo, en zonas endémicas los resultados pueden verse afectados dada previas infecciones por la leptospirosis (8).

1.16.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La RCP es un método altamente sensible usado para el diagnóstico rápido de la infección, los blancos a amplificar son segmentos del ARNr 16S, 23S, los genes *secY* y *flaB*. Esta técnica no está disponible para que se utilizada para uso rutinario ya que sus costos son muy elevados tanto como los reactivos y la implementación de equipos a pesar de sus ventajas. Se ha empleado para diagnósticos de la leptospirosis, aislarlos para la identificación y en muestras ambientales la identificación de la leptospirosis (30)

El PCR detecta la enfermedad de una manera cuantitativa ya que tiene una mayor viabilidad de a los ocho días ser positivos antes de la formación de anticuerpos y por el torrente sanguíneo ocurre la eliminación del organismo (33).

1.17. Medidas de control

1.17.1. Eliminación del reservorio de leptospirosis

Las fundamentales medidas para la erradicación incluyen la desratización en los terrenos, la vacunación de todos los animales domésticos, detectar animales que son portadores y los enfermos, para recibir el tratamiento oportuno en los animales infectados (34).

1.17.2. Evitar la contaminación de los medios referidos

Es crucial evitar el contacto si tienes heridas o cortes con aguas contaminados ya que son reservorios de orina de muchos animales esto implica la eliminación de aguas estancadas de lagos o piscinas que son contaminadas también manteniendo el control de higiénico de los alimentos frescos consumidos. Además, se recomienda realizar cambios en los ambientes ecológicos habilitar o cambiar la estructura de los terrenos y realizar la desratización en lugares como mucho almacenamiento (34).

1.17.3. Evitar el contagio humano con los medios contaminados

Mediante las medidas sanitarias de prohibición al no consumir carne y leche de aquellos animales portadores o enfermos llevando a cabo la desinfección de las verduras y frutas y así asegurar la seguridad alimentaria (35).

1.17.4. Quimioprofilaxis de los casos con riesgo temporal

La quimioprofilaxis se recomienda para individuos con riesgo eventual al contagio con leptospirosis como aquellos que realizan actividades al aire libre o realizar labores en el suelo como también los ríos contaminados con *Leptospira* como los militares y aquellos que trabajan en los sitios agrícolas temporales. En estos casos consisten dar antibiótico como la doxiciclina de 200mg hasta por una semana luego de la exposición (35)

1.18. PREVENCIÓN

A las personas se les debe dar a conocer los riesgos a la exposición de animales o materiales infectados por lo que deben:

- Es recomendable usar ropa impermeable como medida de barrera con las infecciones.
- Mantener una estricta higiene personal.
- Desinfección de áreas y equipos de cualquier contacto animal o material.
- Desechar el material infectado por esterilización o incineración (36).

La leptospira se puede prevenir mediante vacunas anuales contra serotipos diferentes, existen vacunas comerciales que ayudan a proteger contra los serotipos de la Canicola, la icterohaemorrhagiae, la Gryppotyphosa y la Pomona. Prevenir con vacunas ayuda a nuestros perros a que disminuya la prevalencia de la enfermedad. En el país de México, hay laboratorios que comercializan diferentes vacunas contra algunos serotipos. Aún existen pocas vacunas que contengan más de 2 y hasta 4 serotipos. A pesar de esto y tener

vacunas hay un número de personas que no recurren a vacunar a sus mascotas cada año (37).

La vacunación está recomendada para todos aquellos individuos que trabajen cotidianamente con animales con los que pueda contraer leptospirosis como en albergues de animales, los pescadores de ríos, aquellos que trabajan en alcantarilla, etc. La vacuna consiste en una inactivación de células inactivas de *Leptospira interrogans*, que pertenece a los serotipos como la Canicola (serovar canícola), la *Icterohaemorrhagiae* (serovar copenhageni) y la *Pomona* (serovar mozdok) (35).

1.19. Tratamiento

El tratamiento para la leptospirosis depende mucho del estado de la infección y de su gravedad. Se les recomienda monitorear la progresión de aquellos pacientes con la leptospirosis sintomática. La leptospirosis con sintomatología grave requiere tratamiento urgente en la unidad de cuidados intensivos y recibir antibióticos. Los antibióticos que son recomendados para la leptospirosis son la penicilina, la doxiciclina, la ceftriaxona, etc. (19).

por lo general el tratamiento que reciben es doxiciclina y penicilina para los casos graves se utilizan antibióticos como la penicilina G y ceftriaxona. Los pacientes reciben un pronóstico favorable a menos que ya tenga lesiones en sus órganos como los riñones, el hígado y pulmones(38).

En unas situaciones se requiere de la administración intravenosa de antibióticos como la penicilina G, la amoxicilina, y también la ampicilina. El antibiótico que mayor se recomienda en estos casos es la doxiciclina ya que es el mejor antibiótico profiláctico ante una exposición a leptospirosis (19).

1.20. Aguas residuales

Según las normas de calidad ambiental y de descargas de efluentes las aguas residuales son una composición de variada ya que proviene de diferentes descargas de uso de las industrias, los comerciales, los servicios pecuarios y por lo general cualquier uso que haya padecido algún deterioro en la calidad original (39).

Existen demasiados microorganismos patógenos en las aguas residuales por el cual es demasiado peligroso para la salud ya que se han hallado virus, las bacterias, los hongos, los protozoos y los helmintos. Durante el tratamiento de las aguas residuales aquellas personas que trabajan están expuestas a diferentes patógenos y afectar su salud. Factores como las fuentes o los volúmenes de aguas, y las concentraciones de microorganismos

además el crecimiento poblacional, las urbanizaciones hacen que el trabajo sea más difícil para poder mantener limpia y segura el agua. También tenemos un factor importante que es el cambio climático ya que hay variación de temperatura, la humedad y patrones de lluvia(40).

1.20.1. Muestreo de agua residual

Para un análisis la muestra tiene que ser relevante y representativamente por lo que un programa de muestreo tiene que ser crítico. El objetivo de muestrear el agua significa obtener una parte que representa el universo analizado por los variados parámetros de acuerdo con el interés. Para llegar a nuestro objetivo ya que necesitamos conservar la concentración de los componentes y evitar los cambios significativos antes de un análisis (41).

1.20.2. Planificación y Programación del Muestreo

- Determinar la Matriz.
- Seleccionar los puntos y frecuencia del muestreo estando de acuerdo con el objetivo.
- Definir las variables de campo y de laboratorio.
- Definir tipo de muestra sea puntual o compuesta, así como el número y volumen de las muestras.

1.20.2.1. Muestra simple:

Es una muestra individual recogida en un periodo corto donde se emplea el tiempo de extracción para conseguir la capacidad necesaria (42).

1.20.2.2. Muestra compuesta:

Mezclar continuamente las proporciones de manera intermitente y continua con dos muestras por lo cual se obtiene el valor medio con las características deseada. Los porcentajes de las muestras se calculan por lo general con mediciones de flujo (42).

1.20.3. Toma de muestras – Control y Vigilancia

- Definición del método de la medición caudal
- Desplazarse hasta el sitio del muestreo
- Registro en el campo
- Toma de Muestras
- Medir las variables del campo y Registro (pH, Temperatura, Caudal, etc)

- Llenar los recipientes y preservar
- Clasificación o etiquetación
- Sellado de muestras
- Refrigerar para la conservación
- Vehículo
- Entregar las Muestras al laboratorio(41).

1.21. OBJETIVOS

1.21.1. Objetivo general

Determinar la incidencia de *Leptospira icterohemorrágica* en roedores y aguas residuales en el sector norte de la ciudad de Machala mediante la técnica de laboratorio PCR.

1.21.2. Objetivos específicos

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

CAPÍTULO II

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Tipo de estudio.

El presente trabajo, es un estudio de tipo transversal de carácter cuantitativo porque se lo ejecutó en un periodo corto de tiempo, procediendo con la toma de muestra se realiza en un tiempo determinado, para buscar e identificar la presencia o ausencia de *Leptospira* y luego se procedió a la obtención de datos en porcentajes respectivos y su correspondiente descripción, para posterior discusión de resultados.

2.2. Paradigma.

Esta investigación tiene como paradigma identificar la presencia de *Leptospira icterohemorrhagica* en ratas capturadas y aguas residuales recolectadas de las diferentes zonas del norte de la ciudad de Machala

2.3. Localización de estudio

La presente investigación se realizó en el Cantón Machala, provincia de El Oro, en la zona norte de la ciudad en la cual se encuentra la parroquia Providencia, en la investigación se analizó la presencia o ausencia de *Leptospira* en roedores y agua residual de los sectores ubicados dentro de la zona norte de Machala.

2.3.1. Ubicación geográfica y política

Latitud: -3.258520

Longitud: -79.95915

Altitud: 6 msnm

Superficie: 59,93 km²

2.3.2. Ubicación



Fuente: Google maps 2024

2.4. Población

En el siguiente trabajo, la población de estudio abarca a todos los roedores que serán capturados del sector norte del cantón Machala, especies como lo son *Mus musculus*, *Ratus ratus*, *Ratus norvergicus*.

2.5. Muestra

La muestra se seleccionó de los roedores capturados en la zona norte de Machala durante los meses de mayo y junio. Se realizó la captura de 25 roedores y 15 muestras de aguas residuales, utilizando un nivel de confianza de 97% y un margen de error del 5%. Se empleo una proporción estimada y fracaso del 50%

$N = \text{Población} = 40$

$Z^2_{\alpha} = \text{Nivel de confiabilidad (97\%)} = 2.17$

$E^2 = \text{Nivel de error (5\%)} = 0.05$

$p = \text{Proporción de éxito (50\%)}$

$q = \text{Proporción de fracaso (50\%)}$

Cálculo de tamaño de la muestra finita

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

$$n = \frac{40 * (2.17)^2 * 0,5 * 0,5}{(0,05)^2 * (40 - 1) + (2.17)^2 * 0,5 * 0,5}$$

$$n = \frac{40*4.70*0.25}{0.0025*39+4.70*0.25}$$

$$n = \frac{40*1.175}{0.0975+1.17}$$

$$n = 36$$

2.6. Variables

2.6.1. Variables de estudio

- Todos los roedores capturados de la zona norte de Machala
- Aguas residuales presentes en la zona norte de Machala

2.7. Equipos y Materiales

2.7.1. De protección personal.

- Guantes sin talco
- Mascarilla KN 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
- Tijeras
- 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
- Jeringas de 3 ml para extracción de sangre
- Tubos (tapa lila) con EDTA para sangre
- Tubos eppendorf de 1,5 ml para el riñón
- Tubos falcón de 50 ml para la recolección de agua

2.7.4. 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

2.7.5. Materiles del 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 Water
- RNase A

2.7.6. Materiales del kit de agua. (GeneJET Genomic DNA Purification kit)

- Elution Buffer
- Wash Buffer I
- Wash Buffer II
- Digestion Solution (room temperatura)
- Lysis Solution

2.7.7. Otros materiales

- Etanol
- Agua Destilada

- Termociclador
- Centrifuga

2.7.8. Materiales 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 las muestras recolectadas.

2.7.9. Materiales para el descarte del roedor.

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

2.7.10. Muestra de órganos

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

2.8. PROCEDIMIENTO PREVIO A LA NECROPSIA

2.8.1. Para el equipamiento del personal:

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

2.8.2. Para la limpieza del mesón:

1. Se deberá colocar un poco de yodo jabonoso para el lavado
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.

2.8.3. 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.

2.8.4. 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
8. Seguir con los pasos para la toma de muestra sanguínea.

2.8.5. 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 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, obteniendo 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.

2.8.6. 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 juzgen necesarias para exámenes bacteriológicos, con el fin de evitar la contaminación causada por manipulaciones posteriores.

2.8.7. 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

2.8.8. 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 cautelosamente y extraerá la muestra de orina, misma si hay contenido se colocará en un criovial.

2.8.9. 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.

2.8.10. 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 RIÑON - 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.

2.8.11. 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.

2.9. Protocolo para extracción de ADN

2.9.1. Procedimiento para la extracción de ADN de tejido - riñón

1. Mediante el uso de una microgramera debería pesar una porción del riñon 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 digestión 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 tampon 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

2.9.1.1. Purificación de ADN genómico a partir de lisado mediante microcentrífuga

6. Transfiera cada lisado de muestra del tubo de 1,5 ml a un conjunto de mini columna 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

2.9.2. Procedimiento para la extracción de ADN de Sangre

2.9.2.1. 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 esteril
3. Proceso de células o muestra de sangre

- Para célula adherente (hasta 5×10^6 células). Retire el medio de crecimiento y recolecte las células mediante tripsinización o un método de elección resuspendiendo las células en 200 μ l PBS
 - Para células en suspensión (hasta 5×10^6 células). Coseche las células mediante centrifugación. Retire el medio de crecimiento. Resuspenda células en 200 μ l de PBS
 - En un tubo de microcentrífuga estéril agregue hasta 200 μ l de muestra de sangre fresca o congelada (si usa $<200 \mu$ l de muestra de sangre, ajuste el volumen de la muestra a 200 μ l usando PBS. Para procesar muestras de sangre $>200 \mu$ l y hasta 1 ml, aumente todos los volúmenes de reactivo en consecuencia.
4. Transfiera 200 μ l de células o sangre en PBS al tubo que contiene proteinasa K del paso dos
 5. Agregue 20 μ l de RNasa A a la muestra. Mezcle bien mediante agitación breve e incube a temperatura ambiente durante 2 minutos
 6. Agregue 200 μ l 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 μ l de etanol al 96-100% al lisado. Mezclar bien mediante vortex para obtener una solución homogénea
 9. Continúe inmediatamente con el protocolo de purificación

2.9.2.2. 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 ($\approx 640 \mu$ l) preparado con PureLink Genomic Lysis/Binding buffer y etanol a la columna de centrifugación
3. Centrifugar la columna a $10.000 \times g$ 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 μ l de Wash Buffer 1 preparado con etanol de la columna
6. Centrifugar la columna a $10.000 \times g$ 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 más 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)

2.9.3. Procedimiento para la extracción de ADN de 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 traspasa del tubo falcón a los ependor 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 bortex 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 bortex por 15 seg. Y se coloca 400 ul de 50% de etanol y se le da bortex por 3 seg.

9. Se arma el tubo de lavado y encima la columna de filtrado para así 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.

2.10. PROCEDIMIENTO PARA LA PRUEBA qPCR

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

Tabla 3. Secuencia de primers para identificación de *Leptospira spp* (4,5).

Set	Gen	Descripción	Nombre	Secuencia (5' - 3')	Probe dye	Quencher	T° de anillado	Tamaño (bp)	Reacción
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 <i>lipL32</i> de Leptospiras patógenas	F_lip32	AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG			60°C	242	
			R_lip32	GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT					
			taq-189P	FAM-AAA GCC AGG ACA AGC GCC G-BHQ1	FAM	BHQ1			
3	SecY	gen <i>secY</i> 10de L.interrogans	F_Lint2	CTT GAG CCT GCG CGT TAY C			63°C	176	2
			R_Lint2	CCG ATAATT CCA GCG AAG ATC					
			TaqLint2	HEX-CTC ATT TGG TTA GGA GAA CAG ATC A-BHQ1	HEX	BHQ1			
4	rrs(16S)	gen <i>rrs</i> (16s) de Leptospiras patógenas	F_Lept	5' ¹⁷¹ CCCGCGTCCGATTAG3'			60°C	87	
			R_Lept	5' ²⁵⁸ TCCATTGTGGCCGR ^{A/G} ACAC3'					
			P_Lept	5'²⁰⁵(FAM) CTCACCAAGGCGACGATCGGTAGC²²⁸ 3' (BHQ1)	FAM	BHQ1			

Fuente: INSPI

2.10.1. Preparación del Máster 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 4. Reactivos para la preparación del Máster 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

Fuente: INSPI

Tabla 5. Programa del termociclador para las reacciones por PCR dirigidas a *Leptospira*.

Etapa	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	

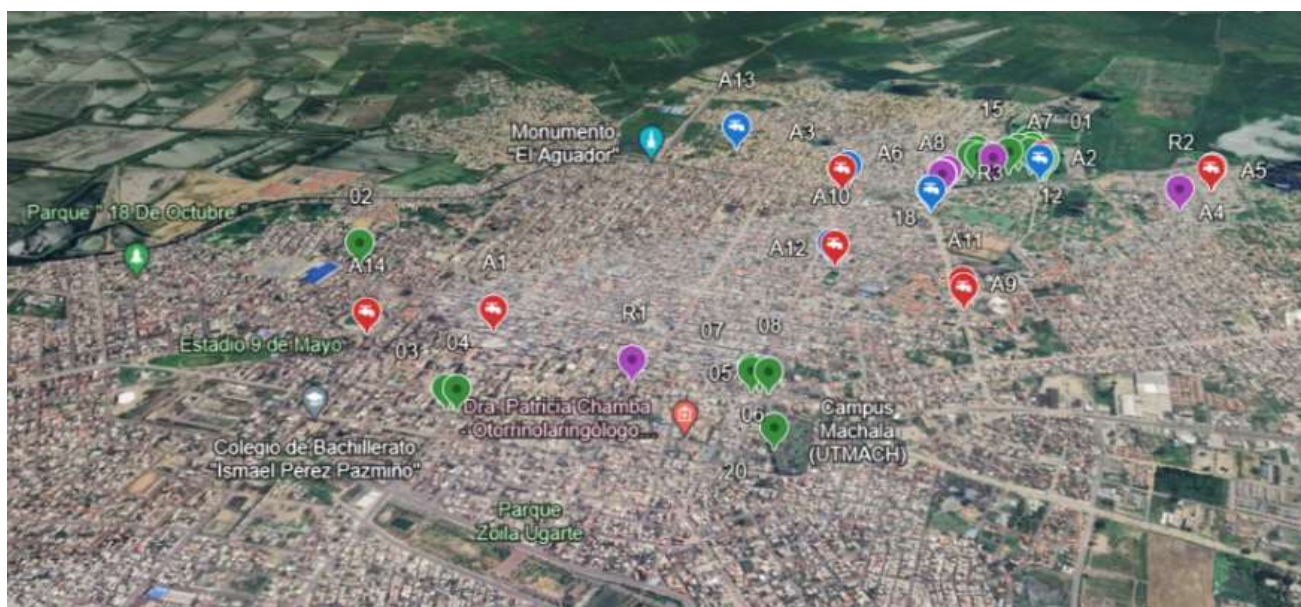
Fuente: INSPI

CAPÍTULO III

III. RESULTADOS

3.1. Elaboración de mapa epidemiológico a partir de la identificación de la presencia o ausencia de *leptospira icterohemorrhagica* en el sector norte

Imagen 1. Mapa epidemiológico de roedores y aguas residuales en la zona norte de la ciudad de Machala



Fuente: Autora

La presente investigación se llevó a cabo con el objetivo de identificar la presencia o no de *Leptospira* en aguas residuales y roedores capturados en diferentes lugares del sector norte de la ciudad de Machala y elaborar un mapa donde se identifique los lugares de recolección y posteriormente identificar los lugares en los cuales hubo presencia de *leptospira* tanto en agua residual y roedores.

En el siguiente mapa epidemiológico se puede observar los diferentes colores que demuestran los lugares específicos de donde fueron extraídas las muestras. En el caso de los roedores se utilizó la sangre y los riñones. De color verde se encuentra representada las 20 muestras de sangre, mientras que las 5 muestras riñones se representa de color morado. Por otro lado, tenemos las 15 muestras de aguas residuales las cuales están divididas en dos colores, de color celeste son las 6 muestras negativas y de color rojo están representadas las 9 muestras positivas. Este esquema de colores facilita la

identificación visual de las áreas de estudio y permite una rápida interpretación de los resultados obtenidos.

3.2. Tabla de tabulación de datos

En la siguiente tabla se encuentran expuestos los 40 datos que fueron tabulados, organizados y clasificados mediante el software estadístico SPSS versión 22 de prueba para Windows, según la tabla Hospedero *Leptospira ictehemorrágica*, se evidencia los datos expuestos respecto a cada variable estudiada, por lo tanto, referente al estudio que se realizó en los roedores, este fue en base la recolección de muestras de sangre y de riñones, por ende la población total es de 40 que corresponde al 100%, en donde el resultado fue que fueron 20 muestras de sangre y 5 muestras de riñones que en total fueron 25 muestras y estas resultaron no tener presencia de leptospira por ende fueron negativas que corresponde al 62,5% respectivamente.

Por otro lado, referente a la variable agua residual, los resultados expuestos en la tabla denotan que se eligió un total de 15 muestras para análisis que corresponden al 100% del estudio en donde 9 muestras del agua resultaron ser positivas ya que se evidenciaba la presencia de *Leptospira ictehemorrágica* lo que corresponde a un 60% mientras que 6 muestras de agua resultaron ser negativas que corresponde al 40% respectivamente.

Las variables expuestas tienen relación ya que denotan la importancia de seguir continuamente en estudio y educación respecto a esta patología, ya que la leptospirosis es una patología que actualmente está creciendo de forma ascendente, los animales y los humanos se pueden enfermar cuando tengan contacto con el agua contaminada con orine del roedor enfermo generándose como un gran problema de salud pública que en ocasiones puede originar sintomatología aparentemente leve, sin embargo puede ocasionar complicaciones, e incluso puede ocasionar la muerte de los individuos.

Tabla 6. Prevalencia o presencia de leptospira en ratas y aguas residuales

			<i>Leptospira icterohemorrágica</i>		Total
			Positivo	Negativo	
Hospedero	Roedor	Conteo	0	25	25
		col % de <i>Leptospira icterohemorrágica</i>	0.0%	62,5%	62,5%
	Agua residual	Conteo	9	6	15
		col % de <i>Leptospira icterohemorrágica</i>	60%	40%	100%
Total	Conteo		9	31	40
	col % de <i>Leptospira icterohemorrágica</i>		22.5. %	77,5. %	100. %

Fuente: Autora

3.3. Tabla por asociación Chi cuadrado.

La asociación probabilística de los datos expuestos en la siguiente tabla es entre las variables de estudio que es el roedor enfermo con leptospirosis como factor exposición y las aguas residuales contaminadas sea por el orine del roedor o por la exposición persistente de esta zoonosis en el agua, por ello tienen relación las dos variables expuestas

Resultó útil el empleo la técnica de muestreo por conveniencia porque nos permitió escoger nuestra muestra representativa para el estudio respectivo, ya que es imposible trabajar con todos los roedores que existen en la zona en estudio y a su vez el ingreso a las aguas residuales, por ende, se logró hacer la captura de 25 roedores y el análisis de 15 aguas residuales a las que se tuvo el acceso disponible, por lo tanto, nuestra población total fue de 40 datos y nuestra muestra de 25 datos respectivamente.

En la zona norte de la ciudad de Machala se capturaron 25 ejemplares a los que se extrajeron 20 muestras de sangre y 5 muestras de riñones, a los que se realizaron pruebas mediante técnicas de biología molecular para detectar *Leptospira* mediante la reacción específica de cadena de polimerasa (PCR). Los resultados obtenidos de esta prueba fueron concluyentes, demostrando que las muestras analizadas de roedores resultaron negativas para la presencia de *Leptospira*, este hallazgo sugiere ausencia de la prevalencia de la

bacteria en la población de roedores en las áreas estudiadas, lo cual podría estar asociado a diferentes como: factores ambientales, captura de animales no contaminados, presencia de cepas diferentes a los convencionales, entre otros.

En la misma zona norte de la ciudad se recolectaron 15 muestras de agua residuales en diferentes lugares, las cuales fueron sometidas a un proceso de análisis con prueba (PCR) para la detección de *Leptospira*. Los resultados obtenidos en estas pruebas revelaron que hay presencia de la bacteria en 9 muestras analizadas y reportadas como positivas, este hallazgo es muy significativo, ya que indica una alta contaminación ambiental por *Leptospira* especialmente en aguas residuales. Estos resultados encienden la alertan ya que esta son fuente de infección en animales y humanos incrementando el riesgo para la salud pública, con la presencia de la enfermedad, alteraciones orgánicas y en algunos casos si no hay un diagnóstico y terapia urgente puede ocasionar la muerte. Por ende, es importante aplicar medidas de saneamiento, control de roedores, eliminar focos con aguas servidas y la aplicación de buenas prácticas sanitarias que ayuden a la reducción de la incidencia de esta patología.

Tabla 7 Resultados de la prueba Chi-Cuadrado por asociación de contagio de *Leptospira*

	Value	Df	p-valor
Pearson Chi-Square	19.355 ^a	1	.000
N of Valid Cases	40		

Fuente: Autora

3.4. DISCUSIÓN

La presente discusión se centra en la evaluación de la presencia de *Leptospira icterohemorrhagica* en roedores y aguas residuales, lo que constituye un importante problema de salud pública (43). De acuerdo a González et al. (2021), la leptospirosis es un patógeno zoonótico que puede transmitirse a los humanos directamente a través del contacto directo con animales infectados o indirectamente a través del agua contaminada (44).

Según el estudio de Dzib Paredes et al. (2022), en el que se tomó en cuenta una muestra de 82 roedores de los cuales se analizaron partes como orejas, riñón y vejiga mediante la extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN), con el fin de detectar *Leptospira*, sus resultados arrojaron que no se pudo encontrar ectoparásitos en los roedores estudiados, siendo el 1.21% es decir 1/82 roedores con resultado positivo (45). Estos registros son similares a los datos obtenidos en nuestra investigación puesto que se realizó en los roedores la recolección de 20 muestras de sangre y 5 muestras de riñones con un total de 25 muestras y estas resultaron no tener presencia de *Leptospira* lo que corresponde al 62,5% de las muestras analizadas respectivamente. Corroborando estos resultados Torres et al. (2024). Reporto datos similares, tomando en cuenta en su investigación una muestra de 45 roedores de los cuales se extrajeron fragmentos del riñón los cuales se utilizaron para la extracción del ADN total. Los resultados arrojaron una frecuencia del 8.5% de positividad a la infección de *Leptospira* es decir 4/45 roedores (46).

Al igual que en otras investigaciones en el presente estudio las pruebas de diagnóstico para *Leptospira* en roedores se realizaron a través de biología molecular, específicamente la reacción de cadena de polimerasa (PCR), los resultados obtenidos fueron concluyentes, demostrando que las muestras analizadas resultaron negativas, lo cual podría estar asociado a factores ambientales que se presentaban cuando fueron obtenidos los ejemplares. Sin embargo, en congruencia con lo mencionado por Núñez et al. 2022, en su estudio "*Efectividad de la Reacción en Cadena de la Polimerasa*" se realizaron pruebas para el diagnóstico temprano de esta afección con la aplicación de PCR-RT e Inmunodot, los resultados obtenidos mediante estas pruebas fueron poco efectivos por lo cual se sugieren mejores resultados mediante la aplicación de PCR-RT en orina (47). Similarmente, Vásquez et al. (2022), determino en su investigación que para que la detección de la enfermedad *Leptospira* mediante PCR o QPCR sea eficaz debe realizarse dentro de los primeros 8 días, antes de la producción de anticuerpos y la eliminación del organismo en el torrente sanguíneo (48).

Según Bautista y otros literatos expresa en su estudio científico respecto a la presencia de *Leptospira icterohemorrágica* en aguas residuales como problema de salud pública en donde realizaron un análisis y los resultados incluyeron que el principal factor predominante fue el agua de los ríos contaminado por *Leptospiras* lo que aumentó el número de casos por enfermedad reportados en Nicaragua, datos exportados por el

Ministerio de Salud Pública. De igual manera en Bogotá se evidenció de forma ascendente nuevos casos de leptospira en climas lluviosos enfermando a población humana y animales domésticos(49).

Becerra y otros autores expresan en su artículo que el factor predominante para la transmisión de *Leptospirosis icterohemorrágico* es el clima húmedo ya que hace al microorganismo más fuerte, es decir de característica duradera, por ende este microorganismo persiste y se prolifera en aguas que generalmente pasan sin movimiento en un solo lugar, pueden sobrevivir alrededor de 3 semanas, sin embargo si es agua dulce pueden resistir 180 días, sin embargo si el hábitad es de característica húmeda como el lodo, la bacteria puede sobrevivir hasta un año respectivamente(50).

Estas investigaciones tienen similitud con nuestro estudio ya que también el análisis de las aguas residuales a las que se analizó se tuvo como factor predominante positivo ya que resultaron positivas las muestras por Leptospirosis, por lo que nos inclinamos por las fundamentaciones de Bautista y Becerra.

Otro estudio realizado en España por Gómez y otros autores respecto a las aguas húmedas de Doñana, se analizó la incidencia de la leptospirosis con un 5,4%, en donde se evidenció que la población infectada fueron trabajadores que cumplen el rol de captura de cangrejos rojos con un 9,8% respectivamente, mientras que los trabajadores que cumplen la función de cosechar arroz fueron de 3,2%. Lo que se concluyó que el mayor riesgo es para el trabajador que cumple la función de captador de cangrejo por la exposición de manos y pies al agua y la humedad(51). Este resultado de este estudio tiene similitud con los resultados de esta investigación ya que también el factor predominante fueron las aguas residuales contaminadas por Leptospirosis que correspondieron a 9 aguas positivas con un 60% respectivamente, por lo cual me inclino por la fundamentación de Gómez.

Asimismo, Bradley et al. (2023), en su estudio menciona que entre los factores que aumentan los valores de contaminación por leptospirosis son aquellos hábitats ribereños, donde se ha documentado casos de contaminación por leptospirosis después de eventos como, inundaciones, tormentas y otros eventos que se vinculan a la transmisión por agua, lo cual provoca que los animales endémicos se contaminen entre un 5% y 20% en dependencia de su especie o condición (52).

Siendo aquello un punto de inflexión donde demuestra que la contaminación no solo se va a centrar en el agua, sino en otras áreas de la población, lo cual concuerda con un estudio que se realizó en Manabí por parte de Miller et al. (2021), quienes tuvieron hallazgos donde al realizar muestras para encontrar leptospirosis, se evidencio que había un 40% de contaminación en el agua y suelo de la comunidad de Abdón Calderón, de los cuales destacaron áreas cercanas a ser propensas a que se inunden y próximas al río (53).

A pesar de que existe un aumento exponencial de contaminación por leptospirosis en áreas costeras del país, como lo demuestra Calvopiña et al.(2023), el cual detalla que en Ecuador se registró 5930 casos sospechosos de leptospirosis en la costa de los cuales 1371 (25.4%) eran casos positivos en el año 2012, no existen programas de control para dicha enfermedad que estén bien establecidos, viendo una necesidad de realizar estrategias y medios de prevención con un enfoque integral de salud (54).

CAPÍTULO IV

IV. CONCLUSIÓN

Se concluye que la *Leptospirosis icterohemorrágica* es una patología crucial altamente infecciosa que se puede transmitir de manera accidental en el área laboral, también en ciertas acciones recreativas e inclusive según los datos analizados en los resultados que obtuvimos fue mayormente la tasa de incidencia por escenarios ocasionados por la naturaleza como las inundaciones, aguas profundas estancadas. Esta enfermedad va generando impacto en la salud pública y en el campo de la salud veterinaria ya que perjudica el estado de salud del ser humano y de algunos animales, provocando de forma drástica disminución en el periodo de vida de los animales y disminuyendo la calidad del estado de salud de la persona, todo esto por la falta de conocimiento del individuo de esta enfermedad, en muchos de los casos generando un diagnóstico erróneo y por ende una atención deficiente generando así casos de mortalidad humana. Por ello resultó importante la intervención que se realizó ya que se pudo evidenciar que las aguas residuales fueron el principal factor para que esta zoonosis se encuentre persistente. Seguir con la sensibilización de la población respecto a estrategias de salud de higiene y limpieza, de bioseguridad con la finalidad de ir controlar y prevenir esta patología y a su vez con el paso del tiempo ir erradicando.

CAPITULO V

V. RECOMENDACIONES

- Se recomienda la utilización de protocolos de muestreo y de análisis estandarizados, que sean claros y proporcionen datos detallados para el muestreo de los roedores y de las aguas residuales, con el fin de que se garantice la consistencia y calidad de las muestras.
- Así mismo se recomienda que se establezca una base de datos que este centralizada con el fin de registrar todos los resultados del análisis de la biología molecular (PCR) y de las muestras recolectadas, facilitando de esta manera el seguimiento y la comparación de los resultados y datos obtenidos a lo largo del tiempo.
- Diseño e implementación de un programa educativo y de concientización que este dirigido a las asociaciones del Norte referente a los riesgos y las medidas de prevención contra la leptospirosis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abgueguen P. Leptospirosis. EMC - Tratado de Medicina [Internet]. 2014 Dec;18(4):1–10. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S163654101469228X>
2. Valverde Federico, Ortega Verónica. Incidencia, prevalencia e identificación de factores de riesgo asociados a la infección por leptospira. Dom Cienc. 2021;7(4).
3. Calvopiña M, Romero-Alvarez D, Vasconez E, Valverde-Muñoz G, Trueba G, Garcia-Bereguaiin MA, et al. Leptospirosis in Ecuador: Current Status and Future Prospects. Vol. 8, Tropical Medicine and Infectious Disease. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
4. Silva-Díaz H, Llatas-Cancino DN, Campos-Sánchez MJ, Aguilar-Gamboa FR, Mera-Villasis KM, Valderrama-Ayén M. Frecuencia de leptospirosis y características socio-demográficas en pacientes febriles del norte del Perú. Rev Chilena Infectol [Internet]. 2015; Available from: www.sochinf.cl
5. Hernández Cabezas M, Luis Mauri Pérez J, Vargas Yzquierdo J, Hernández Cabezas M. Leptospirosis humana: un abordaje epidemiológico desde los factores ambientales Human leptospirosis: an epidemiologic approach from environmental factors [Internet]. Vol. 33, Revista Cubana de Medicina General Integral. 2017. Available from: <http://scielo.sld.cu><http://scielo.sld.cu>
6. Peña S, Mayorga J, Montoya R. Propuesta de tratamiento de las aguas residuales de la ciudad de Yaguachi (Ecuador). Ciencia e Ingeniería. 2018;39.
7. Rodríguez Alonso C, de Haz G, José H, de la Paz C. Leptospirosis humana: ¿un problema de salud? Rev Cub Salud Publica [Internet]. 2000;26(1):27–34. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=21400105>
8. Aranzazu Ceballos AD, Apraez Henao L, Ortiz Marín DC. Leptospirosis en pediatría, un diagnóstico a tener en cuenta Leptospirosis en pediatría, un diagnóstico a tener en cuenta. Rev Chilena Infectol. 2020;

9. Jesús MC, Ainhoa BS, Mikel GG, Iker GH, Aitor AK, Miriam ML. Diagnóstico y manejo de *Leptospirosis icterohemorrhagica*: a propósito de un caso. 2021.
10. Torres-Castro M, Hernández-Betancourt S, Agudelo-Flórez P, Arroyave-Sierra E, Zavala-Castro J, Puerto FI. Revisión actual de la epidemiología de la leptospirosis. Vol. 54, Revista médica del Instituto Mexicano del Seguro Social. 2016.
11. Carranza Zamora AJ, Chang Fonseca D, Gutierrez López Y. Leptospirosis y enfermedad de Weil. Revista Médica Sinergia. 2020;5(3).
12. Yoan Ordoñez-Álvarez L, Bárbara *, Rosario Hernández-Bravo D, Parra-Rodríguez K, Cándano-Acosta AM, Labrador-Alemán R, et al. Caracterización clínico epidemiológica de pacientes con leptospirosis humana sospechada. Rev Ciencias Médicas. 2023;27:5742.
13. Gestal MC, Holban AM, Escalante S, Cevallos M. Epidemiology of tropical neglected diseases in Ecuador in the last 20 years. PLoS One. 2015 Sep 22;10(9).
14. Torres Torres JM, Sánchez Sánchez JG, Deleg Guartán RC, Poma Macías JJ. Síndrome de Weil, *Leptospirosis icterica*. Mediciencias UTA. 2020;4(1).
15. MSP. Leptospira Ecuador 2022. Subsecretaria Nacional de Vigilancia de la Salud Pública. 2022;
16. Bautista T BR, Bulla Castañeda DM, López B HA, Díaz A AM, Pulido M MO. Leptospirosis: enfermedad de gran importancia en salud pública. Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA. 2019;11(2).
17. Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: Dynamics of infection in the changing world. Vol. 17, Clinical Microbiology and Infection. Blackwell Publishing Ltd; 2011. p. 494–501.
18. Scialfa E, Bolpe J, Bardón JC, Ridao G, Gentile J, Gallicchio O. Isolation of *Leptospira interrogans* from suburban rats in Tandil, Buenos Aires, Argentina. Rev Argent Microbiol. 2010;42(2).

19. Nagraik R, Kaushal A, Gupta S, Sharma A, Kumar D. Leptospirosis: A systematic review. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2020 Jun 1;9(6):1099–109.
20. Carrión Montaña KE, 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 Jun 30;13(1):25–30.
21. Mitchell MA, Hungerford LL, Nixon C, Esker T, Sullivan J, Koerkenmeier R, et al. Serologic survey for selected infectious disease agents in raccoons from Illinois. *J Wildl Dis*. 1999;35(2).
22. Grimm K, Mitchell MA, Thompson D, Maddox C. Seroprevalence of *Leptospira* spp. in Blanding's Turtles (*Emydoidea blandingii*) from DuPage County, Illinois USA. *J Herpetol Med Surg*. 2015;25(1–2).
23. Grimm K, Rivera NA, Fredebaugh-Siller S, Weng HY, Warner RE, Maddox CW, et al. Evidence of leptospira serovars in wildlife and leptospiral dna in water sources in a natural area in eAst-Central Illinois, USA. *J Wildl Dis*. 2020;56(2).
24. Pedersen K, Anderson TD, Bevins SN, Pabilonia KL, Whitley PN, Virchow DR, et al. Evidence of leptospirosis in the kidneys and serum of feral swine (*Sus scrofa*) in the United States. *Epidemiol Infect*. 2017;145(1).
25. Browne ES, Callefe JLR, DE Jesus ERS, Zeppelini CG, Cremonese C, Costa F. A Systematic Review of the geographic distribution of pathogenic *Leptospira* serovars in the Americas, 1930-2017. *An Acad Bras Cienc*. 2022;94(3).
26. Miller E, Barragan V, Chiriboga J, Weddell C, Luna L, Jiménez DJ, et al. *Leptospira* in river and soil in a highly endemic area of Ecuador. *BMC Microbiol*. 2021;21(1).
27. Chuva Castillo P, Castillo Hidalgo E. Leptospirosis una enfermedad zoonótica, breve revisión de la situación en el Ecuador. *Anatomía Digital*. 2022 Sep 7;5(3):292–305.

28. Lorena González Torres A, Liliana Monroy Díaz Á, Di Filippo Iriarte G. Factores asociados a la infección por leptospira: una revisión de literatura. *Ciencia y Salud Virtual*. 2018;10(2).
29. Céspedes Z M. Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Emergente. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2005;22(4).
30. Elias YP, Fuentes AMO, Rodríguez Reyes I del C, González MJA. Actualización en el diagnóstico de la leptospirosis humana. Vol. 44, *Revista Cubana de Medicina Militar*. 2015.
31. Oyamada Y, Ozuru R, Masuzawa T, Miyahara S, Nikaido Y, Obata F, et al. A machine learning model of microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis. *PLoS One*. 2021;16(11 November).
32. Behera SK, Sabarinath T, Ganesh B, Mishra PKK, Niloofa R, Senthilkumar K, et al. Diagnosis of Human Leptospirosis: Comparison of Microscopic Agglutination Test with Recombinant LigA/B Antigen-Based In-House IgM Dot ELISA Dipstick Test and Latex Agglutination Test Using Bayesian Latent Class Model and MAT as Gold Standard. *Diagnostics*. 2022;12(6).
33. Díaz Iturra C, Altamirano-Lagos MJ, Vasquez AE, Altamirano-Lagos MJ, Iturra CD. Análisis de proteínas de *Leptospira* y su uso potencial en el desarrollo de métodos rápidos de detección de IgG e IgM para uso humano y veterinario. *Revista del Instituto de Salud Pública de Chile*. 2022;6(2).
34. Ordóñez-Álvarez LY, Díaz-Alfonso H, Blanco-Rodríguez JE, Morejón-Gómez D. Algoritmo diagnóstico y terapéutico de la sospecha de leptospirosis humana desde la Atención Primaria de Salud. *Salud, Ciencia y Tecnología - Serie de Conferencias*. 2022;1(3).
35. María DA, Conejero S, Marcial J, Morales O, Sandra D, Miranda C, et al. Prevention of human leptospirosis in the community [Internet]. Vol. 44, *Revista Cubana de Medicina Militar*. 2015. Available from: <http://scielo.sld.cu>
36. W. A. Ellis, S. J. Macdowell. Chapter 11 Leptospirosis. FAO. 2015;

37. Andrade-Silveira ED los A, Ortega-Pacheco A, Jiménez-Coello M, Cárdenas-Marrufo M. La leptospirosis en perros: zoonosis endémica y prevenible en Yucatán. *Bioagrobiocencias*. 2023;16(1).
38. Izquierdo Vásquez JV, Bravo Roche G, Robles Urgilez M, Robles Urgilez A. Leptospirosis factores de riesgo, diagnóstico y manejo actualizado. *Journal of American health*. 2023 Aug 27;6.
39. TULSMA. REFORMA TEXTO UNIFICADO LEGISLACION SECUNDARIA, MEDIO AMBIENTE, LIBRO VI, Decreto Ejecutivo 3516, Registro Oficial Suplemento 2, 31/03/2003 [Internet]. 2015. Available from: www.lexis.com.ec
40. Cuenca - Lozano MF, Espinosa Armijos MF, Guaya D. Riesgo biológico asociado al tratamiento de aguas residuales: caso de estudio usando la metodología BIOGAVAL. *AXIOMA*. 2023;1(28).
41. Díaz Aguirre S, Mayari R, Del Carmen Espinosa M, Hernández Díaz R. Metodología para el Muestreo y Manipulación de muestras de Aguas y Aguas Residuales en un Labmovil. (Spanish). *Revista CENIC Ciencias Químicas*. 2005;36.
42. Gómez Mendoza RF, Sánchez Zarza Manuel. Muestreo y preservación de parámetros físico-químicos. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. 2001;
43. Dzib Paredes G, Rodríguez Vivas RI, Panti May A, Noh Pech H, Rosado Aguilar JA, Torres Castro M. Incidencia, prevalencia e identificación de factores de riesgo asociados a la infección por leptospira. *Redalyc* [Internet]. 2021 [cited 2024 Jul 29];7(4):152–72. Available from: <https://dominiodelasciencias.com/ojs/index.php/es/article/view/2415/5328>
44. González J, Manzano M, Manzano P, Espin G, Bordies Y, Vazquez A, et al. Terapia de reemplazo renal continua. Presentación de un caso. *Scielo* [Internet]. 2021 [cited 2024 Jul 29];43(6):1740–50. Available from: <http://scielo.sld.cu/pdf/rme/v43n6/1684-1824-rme-43-06-1747.pdf>
45. Dzib-Paredes G, Rodríguez-Vivas RI, Panti-May A, Noh-Pech H, Rosado-Aguilar JA, Torres-Castro M. Frecuencia de *Borrelia burgdorferi* sensu lato

- y *Leptospira* spp. en pequeños roedores de Yucatán, México. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias. 2022 Jul 5;XXXII(single):1–8.
46. Torres–Castro M, Suárez–Galaz A, Yeh–Gorocica A, Sosa–Bibiano E, Loría–Cervera N, López–Ávila K, et al. Identification of *Leptospira interrogans* in *Ototylomys phyllotis* (Rodentia: Cricetidae) from Yucatan, Mexico. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias. 2024 Jun 26;XXXIV(2):1–8.
 47. Núñez MZ, Fortuna ML, Veras B, Medina A, Mena L, Gutiérrez E, et al. Efectividad de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT) e Inmunodot en el diagnóstico temprano de leptospirosis: análisis comparativo con la prueba de Microaglutinación (MAT). Ciencia y Salud. 2022 Feb 27;6(1):17–24.
 48. Vasquez AE, Altamirano-Lagos MJ, Díaz Iturra C. Análisis de proteínas de *Leptospira* y su uso potencial en el desarrollo de métodos rápidos de detección de IgG e IgM para uso humano y veterinario. Revista del Instituto de Salud Pública de Chile. 2022 Dec 31;6(2).
 49. Bautista T BR, Bulla Castañeda DM, López B HA, Díaz A AM, Pulido M MO. Leptospirosis: enfermedad de gran importancia en salud pública. Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA. 2019;11(2):727.
 50. Barrera Cepeda DL, Torres Martínez DS, Orjuela Vargas L. Factores de riesgo de leptospirosis y sus métodos diagnósticos. Revista Med. 2023;30(2):77–90.
 51. Gómez-Martín MC, Rodríguez-Benjumbeda LM, de Eguilior-Mestre MC, Lozano-Domínguez MC, Luque-Márquez R, Jódar-Sánchez F, et al. Epidemiología de la leptospirosis en los humedales del sur de España. Gaceta Sanitaria. 2023;37:102288.
 52. Bradley EA, Lockaby G. Leptospirosis and the Environment: A Review and Future Directions. Vol. 12, Pathogens. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.

53. Miller E, Barragan V, Chiriboga J, Weddell C, Luna L, Jiménez DJ, et al. *Leptospira* in river and soil in a highly endemic area of Ecuador. *BMC Microbiol.* 2021 Dec 1;21(1).
54. Calvopiña M, Romero-Alvarez D, Vasconez E, Valverde-Muñoz G, Trueba G, Garcia-Bereguain MA, et al. *Leptospirosis in Ecuador: Current Status and Future Prospects.* Vol. 8, *Tropical Medicine and Infectious Disease.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.

ANEXOS.



Foto 2. Colocación de trampas Sherman para roedores



Foto 3. Recolección y etiquetación de aguas residuales



Foto 4. Recolección de agua en la zona norte de la ciudad de Machala



Foto 5. Indicaciones para la adquisición de nuevas trampas



Foto 6. Sacrificio de roedores: Extracción de órganos y sangre



Foto 7. Colocación de órganos en los tubos eppendorf.

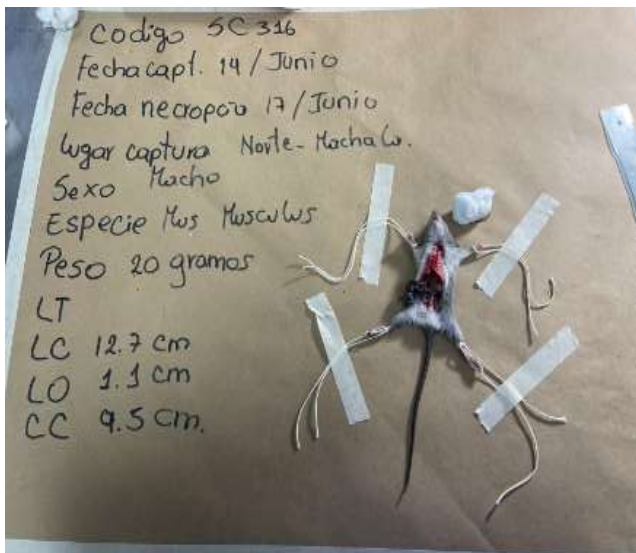


Foto 8. Registro de cada roedor con su código y características

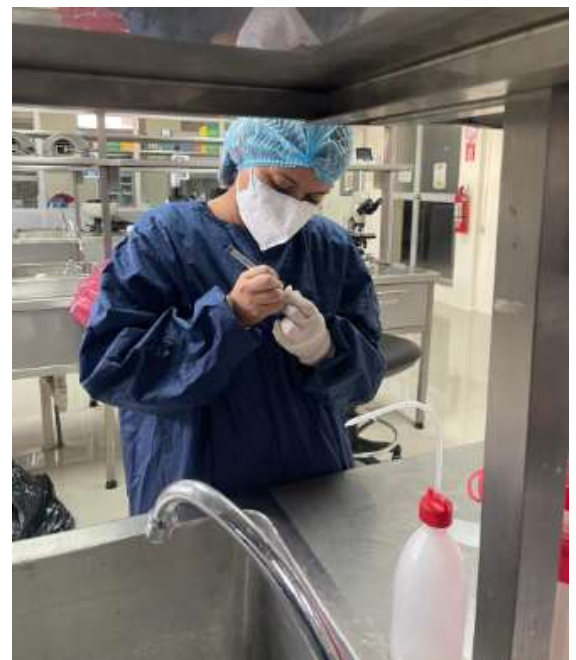


Foto 9. Rotulación de tubos EDTA y eppendorf



Foto 10 Descongelación de las muestras de riñones y sangre



Foto 11. Kit para la extracción de ADN en agua (GeneJET Genomic DNA Purification kit)



Foto 12. Kit para la extracción de ADN en sangre (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific)



Foto 13. Kit para la extracción de ADN en riñón (Wizard SV Genomic DNA Purification System)

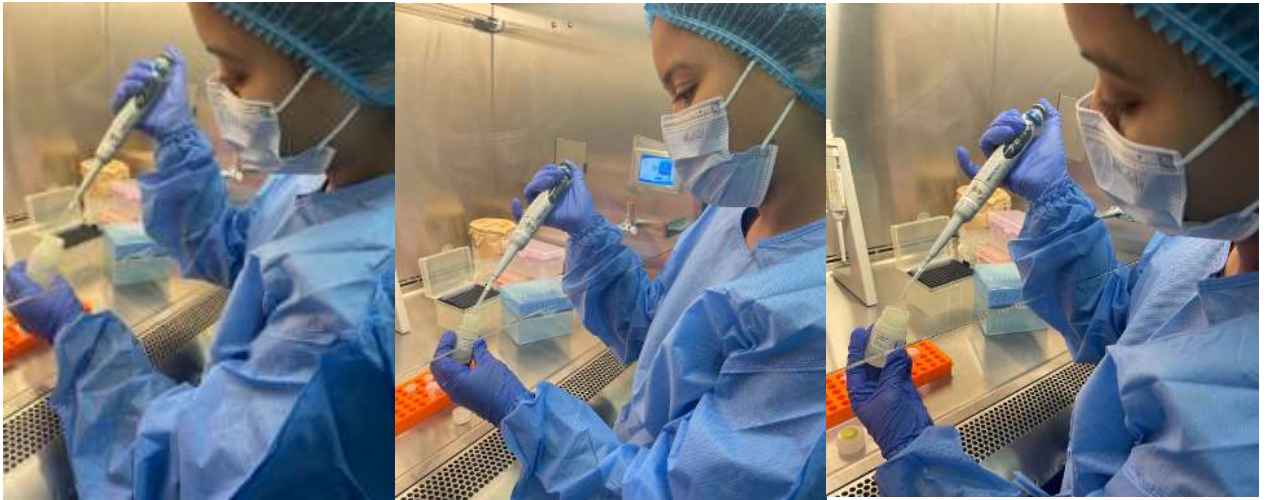


Foto 14. Utilización de los kit para las extracciones de ADN de agua, sangre y riñón



Foto 15. Recolección de muestra de agua para la extracción del pellet y ADN



Foto 16. Cambio de puntas en las pipetas



Foto 17. Extracción de pellet final ya filtrado



Foto 18. Colocación de las muestras en el termociclador



Foto 19. Colocación de la muestra de riñón en la balanza



Foto 20. Colocación de las muestras en la centrifuga



Foto 21. Muestras finales para la prueba qPCR



Foto 22. Extracción de la muestra finales con pipetas para ser colocadas en los pocillos



Foto 23. Fotografía final de agradecimiento al Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación "INSPI"