



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

TRABAJO DE TITULACIÓN

Previo la obtención del Título de:

MÉDICO VETERINARIO

MODALIDAD

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TEMA

Evaluación de la capacidad de eliminación de *Leptospira* patógena en orina a través de las características asociadas a la presentación de la infección en perros domésticos de los cantones Manta, Portoviejo y Sucre

AUTORES:

Ferrín Vera Yolanda Daniela

Mera Párraga Dairis Alexandra

TUTOR

Dr. Víctor Montes Zambrano PhD

SANTA ANA -MANABÍ

2022

DEDICATORIA

Estas palabras van dirigidas a todas aquellas personas que han sido parte de mi vida durante todos estos años de estudio, especialmente a Dios que es mi impulso, mi fortaleza, mi ayuda; que he necesitado para cumplir mis metas en una sociedad que no es nada fácil.

Dedico este proyecto con todo mi amor y cariño a MI MADRE por ser el pilar más importante de mi formación profesional quien dedicó su vida a la mía ayudándome a cumplir mis sueños, demostrando siempre su cariño y apoyo incondicional. A mi padre, a pesar de nuestra distancia física, siento que estás conmigo siempre, aunque nos faltaron muchas cosas por vivir juntos, sé que este momento hubiera sido tan especial para ti como lo es para mí.

Ferrín Vera Yolanda Daniela

DEDICATORIA

Dedico este trabajo primeramente a Dios, por permitirme estar viva y lograr esta meta en mi vida. A mis padres que han sido mi fuente de apoyo a lo largo de mi vida y de mis estudios. A mi hijo Kayler Daniel por ser un angelito que llego a mi vida y me ha dado fuerzas para seguir adelante en este trayecto de vida. A mi hermana María por estar ahí conmigo y apoyarme. También a mis mascotas Sindi, Tyson, Istar y Jack que fueron y son los seres que me inspiraron a seguir esta carrera. Al Doctor Víctor Montes por ser mi tutor y guiarme en cada paso que daba en este trabajo de investigación. A mi compañera de tesis por apoyarme, y al grupo GEEZE por haberme permitido formar parte de él.

Dairis Alexandra Mera Párraga

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por brindarme vida y salud para poder conseguir este logro en mi vida y permitirme haber llegado hasta acá, porque sin el nada de esto hubiera sido posible. A mis padres y hermanas por no dejar de creer en mí.

Agradezco a familiares y amigos que aportaron con un grano de arena para poder llevar a cabo este proyecto investigativo.

También a cada una de las personas que nos permitieron extraer las muestras de orina de sus mascotas para poder llevar a cabo este trabajo investigativo

Dairis Alexandra Mera Párraga

AGRADECIMIENTO

“Caminante, no hay camino, se hace camino al andar”

Hoy terminó un ciclo en mi vida, con el tiempo aprendemos a valorar los momentos que nos da la vida, por eso quiero agradecer con mucho aprecio, principalmente a Dios que me dio la fortaleza y valor para vivir esta bonita experiencia.

Me faltarán páginas para agradecer a las personas que se han involucrado en la elaboración de este trabajo por ello merecen reconocimiento especial, mi madre que desde pequeña me inculcó la disciplina de estudiar y luchar por mis sueños, a mi padre por ser un punto clave para salir adelante.

En la vida conocemos a muchas personas y entre tantas siempre coincidimos con personas especiales con las cuales he compartido grandes momentos y siempre están ahí, en las buenas y en las malas en este caso MIS AMIGAS y no podía faltar el grupo Geeze por enseñarme y brindarme sus conocimientos que enriquecieron mi aprendizaje.

Finalmente quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento al Dr. Víctor Montes, mi guía durante todo este proceso, quién, con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo investigativo.

Ferrín Vera Yolanda Daniela

CERTIFICACIÓN

Dr. Víctor Montes Zambrano, certifica que el trabajo de titulación en la modalidad proyecto de investigación titulada: Evaluación de la capacidad de eliminación de *Leptospira* patógena por orina e identificación de las características asociadas a la presentación de la infección en perros domésticos de los cantones Manta, Portoviejo y Sucre, es trabajo original de los señores estudiantes: Ferrín Vera Yolanda Daniela y Mera Párraga Dairis Alexandra, el que ha sido realizado bajo mi supervisión.

Dr. Víctor Montes Zambrano PhD
TUTOR DE TITULACIÓN

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

TRABAJO DE TITULACIÓN

TEMA:

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ELIMINACIÓN DE LEPTOSPIRA
PATÓGENA EN ORINA A TRAVES DE LAS CARACTERÍSTICAS
ASOCIADAS A LA PRESENTACIÓN DE LA INFECCIÓN EN PERROS
DOMÉSTICOS DE LOS CANTONES MANTA, PORTOVIEJO Y SUCRE**

Sometida a consideración del tribunal de defensa designado por el H. Consejo
Directivo como requisito previo a la obtención del título de:

MEDICO VETERINARIO

APROBADO POR EL TRIBUNAL DE DEFENSA

Dr. Juan José Zambrano Villacis. **Mg Sc**
DECANO-PRESIDENTE

Dr. Víctor Montes Zambrano, **Ph D.**
TUTOR DE TITULACIÓN

Dra. Patricia Zambrano Gavilanes
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dra. Laura De La Cruz Veliz
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Arnaldo Del Toro Ramírez **PhD**
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTORIA

Nosotras Ferrín Vera Yolanda Daniela y Mera Párraga Dairis Alexandra, declaramos que el trabajo investigativo titulado “Evaluación de la Capacidad de Eliminación de Leptospira Patógena por orina e identificación de las características asociadas a la presentación de la infección en perros domésticos de los Cantones Manta, Portoviejo y Sucre” es de nuestra total autoría.

Por la presente concedemos el permiso a la Universidad Técnica de Manabí hacer uso de todo o parte del contenido de esta obra, con fines estrictamente educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Ferrín Vera Yolanda Daniela

Mera Párraga Dairis Alexandra

INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTO.....	III
CERTIFICACIÓN.....	V
DECLARACIÓN DE AUTORIA.....	VII
INDICE DE TABLA.....	X
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. ANTECEDENTES.....	5
III. JUSTIFICACIÓN.....	6
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
V. HIPÓTESIS.....	8
VI. OBJETIVOS.....	9
6.1 OBJETIVO GENERAL.....	9
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
VII. MARCO TEÓRICO.....	10
7.1 Aspecto Teórico.....	10
7.2 Leptospirosis.....	10
7.3 Leptospira.....	11
7.3.1 Clasificación.....	11
7.3.2 Epidemiología.....	11
7.3.3 Reservorios.....	12
7.3.4 Transmisión.....	12
7.3.5 Vías de transmisión.....	12
7.3.6 Patogénesis.....	13
7.3.7 Signos Clínicos.....	13
7.3.8 Factores de riesgo.....	14
7.3.9 Diagnóstico.....	14
7.3.10 Medidas de control.....	15
7.4 Leptospirosis en caninos.....	16
VIII. DISEÑO METODOLÓGICO.....	18
8.1 Tipo de estudio.....	18
8.2 Criterios de inclusión.....	18

8.3	Cálculo de muestra	18
8.4	Recolección y procesamiento de la muestra de orina.....	18
8.5	Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	19
	Tabla 1: Cebadores contra Leptospira patógenas usada en el PCR	19
	Tabla 2: Concentración de reactivos del master mix	20
8.6	Gel de electroforesis.....	20
8.7	Aplicación de encuesta epidemiológica	20
8.8	Análisis estadístico	20
IX. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN		21
9.1	Característica de los animales seleccionados de acuerdo con la raza..	21
	Tabla 3: Porcentaje de caninos por raza utilizados en el estudio	21
9.2	Característica de los animales seleccionados de acuerdo al Sexo....	21
	Tabla 4: Características por sexo de los caninos muestreados en el estudio..	21
9.3	Característica de los animales seleccionados de acuerdo con la Edad.	21
	Tabla 5:Características por edad de los caninos seleccionados para el estudio	22
9.4	Característica de los animales seleccionados de acuerdo con su procedencia	22
	Tabla 6: Porcentajes de cantones seleccionados en el estudio.	22
9.5	Característica de los animales seleccionados de acuerdo a su procedencia	22
	Tabla 7: Características de los caninos seleccionados para el estudio de acuerdo a su ambiente de crianza.	22
9.6	Prevalencia de Leptospira patógena por medio de PCR convencional en perros de la provincia de Manabí	23
	Tabla 8: Total de caninos Positivos a la PCR	23
9.7	Encuesta epidemiológica realizada de acuerdo al resultado obtenido por PCR	23
	Tabla 9: Característica de los animales positivos a la PCR de Leptospiras Patógenas en caninos de la provincia de Manabí.....	25
X.	DISCUSIÓN	26
XI.	CONCLUSIONES	30
XII.	RECOMENDACIONES	31
XIII.	PRESUPUESTO	32
XIV.	CRONOGRAMA	33
XV.	BIBLIOGRAFIA.....	34
XVI.	ANEXOS	45

INDICE DE TABLA

Tabla 1: Cebadores contra Leptospira patógenas usada en el PCR	19
Tabla 2: Concentración de reactivos del master mix	20
Tabla 3: Porcentaje de caninos por raza utilizados en el estudio.....	21
Tabla 4: Características por sexo de los caninos muestreados en el estudio.	21
Tabla 5: Características por edad de los caninos seleccionados para el estudio	22
Tabla 6: Porcentajes de cantones seleccionados en el estudio.....	22
Tabla 7: Características de los caninos seleccionados para el estudio de acuerdo a su ambiente de crianza.....	22
Tabla 8: Total de caninos Positivos a la PCR.....	23
Tabla 9: Característica de los animales positivos a la PCR de Leptospiras Patógenas en caninos de la provincia de Manabí.....	24

RESUMEN

La Leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial, causada por una bacteria espiroqueta móvil del género *Leptospira*, perteneciente a la familia leptospiraceae, que comprende dos especies fenotípicas: *Leptospira interrogans* y *Leptospira biflexa*, la cual afecta a más de 160 especies de animales domésticos y silvestres, transmitiéndose por contacto directo de mucosas o piel erosionada con orina infectada, suelo, agua, alimento contaminado y también por la ingesta de tejidos infectados. El presente trabajo buscó detectar la proporción de caninos eliminadores de *Leptospira* patógena por orina utilizando un estudio de tipo transversal, con un muestreo no probabilístico, el tamaño de la muestra fue tomada asumiendo un nivel de confianza del 95%, una prevalencia esperada de 26 % y un error aceptado del 5 % para los cantones Manta, Portoviejo y Sucre de la provincia de Manabí, recolectando un total de 298 muestras de orina. El ADN obtenido de las muestras fue analizado mediante la PCR convencional dirigido al gen lipL32 (HAP1) principal proteína de membrana externa encontrada en especies de *Leptospira* patógena. Obteniendo un resultado de 2,01% (6/298) de prevalencia de ADN de *Leptospira* patógena, donde los mayores casos de positividad provinieron de caninos con propietarios, en comparación con los animales sin dueño. Se recomienda vacunar a los caninos contra *Leptospira* ya que la bacteria permanece por mucho tiempo en el ambiente y puede estar siendo liberada por hospedadores de mantenimiento infectando animales susceptibles.

Palabras claves: *Leptospira* patógena, PCR convencional, Gen lipL32, ADN, Fenotípicas, Zoonosis.

SUMMARY

Leptospirosis is a zoonosis with worldwide distribution, caused by a motile spirochete bacterium of the genus *Leptospira*, belonging to the Leptospiraceae family, which includes two phenotypic species: *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa*, which affects more than 160 species of domestic and wild animals, being transmitted by direct contact of mucous membranes or abraded skin with infected urine, soil, water, contaminated food and also by ingestion of infected tissues. The present work sought to detect the proportion of canines that eliminate pathogenic *Leptospira* by urine using a cross-sectional study, with a non-probabilistic sampling, the sample size was taken assuming a confidence level of 95%, an expected prevalence of 26%. and an accepted error of 5% for the cantons of Manta, Portoviejo and Sucre in the province of Manabí, collecting a total of 298 urine samples. The DNA obtained from the samples was analyzed by conventional PCR targeting the lipL32 (HAP1) gene, the main outer membrane protein found in pathogenic *Leptospira* species. Obtaining a result of 2.01% (6/298) prevalence of pathogenic *Leptospira* DNA, where the highest cases of positivity came from canines with owners, compared to animals without an owner. It is recommended to vaccinate canines against *Leptospira* since the bacterium remains in the environment for a long time and may be released by maintenance hosts infecting susceptible animals.

Key words: Pathogenic *Leptospira*, PCR conventional, LipL32 gene, DNA, Zoonosis.

I. INTRODUCCIÓN

La Leptospirosis es producida por bacterias del género *Leptospira* la cual corresponde a la familia Leptospiraceae, del orden Spirochateales Lara *et al.* (2015). La Leptospirosis es una patología que afecta principalmente a los animales domésticos o salvajes, pero puede transmitirse a los humanos, provocando en ocasiones una enfermedad renal o hepática grave (Tortora *et al.*, 2007).

La Leptospirosis humana muchas veces es confundida con otras patologías como Malaria, Zika y Dengue por presentar características clínicas muy parecidas como: el síndrome febril, diarrea, vómito, dolor abdominal y letargia, por tal motivo es difícil diferenciarlas en etapas tempranas (Nuñez *et al.*, 2015).

Los roedores están estrechamente relacionados con *Leptospira*, por lo cual el microorganismo se mantiene viable, se multiplica y se elimina a lo largo de la vida, e incluso pueden transmitir la bacteria a sus crías durante el periodo embrionario a través de la placenta, son asintomático, alojan una variedad de serotipos patógenos, contribuyen a la circulación en ciertas áreas definidas sin involucrar los huéspedes sintomático, también son considerado principales diseminadores por su capacidad de eliminar *Leptospira* en la orina facilitado por su pH alcalino Ospina *et al.* (2017), Los caninos se pueden infectar por el medio de la orina de los roedores, principalmente en invierno por las aguas estancadas, estos animales domésticos son una alta fuente de contagio e incluso pueden llegar a contagiar al ser humano (Alonso, 2020).

La Leptospirosis canina es una enfermedad clínicamente hiperaguda, aguda o crónica, en donde las manifestaciones clínicas son diversas y no necesariamente implican ictericia, la mayoría de ellas son manifestaciones subclínicas, por lo que usualmente se diagnostican por los hallazgos serológicos y que en casos crónicos llegan a producir el deceso del paciente. Los animales recuperados de esta patología pueden llegar a convertirse en portadores y diseminar la bacteria a través de la orina, que es un factor de riesgo y un eslabón importante en la cadena epidemiológica de la Leptospirosis humana (Luna *et al.*, 2008).

Arroyo (2011) menciona que la manifestación de síntomas varía dependiendo del serovar y si el hospedador es primario o secundario. Si el animal es el hospedador

primario hay una reacción serológica baja y los signos clínicos son leves, logrando o no aparecer daño renal crónico; en hospedadores secundarios la severidad de síntomas es superior, dependiendo de la susceptibilidad del animal, en la cual presenta fiebre, inapetencia, vómito, dolor abdominal, diarrea, poliuria, polidipsia, mialgia, ictericia, hematuria e infertilidad.

Los métodos para el diagnóstico de la *Leptospira* son la prueba de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), la Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT), y pruebas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Esta última, demuestra ser útil en diversos patógenos (Avilés *et al.*, 2018).

La prueba molecular de PCR es un método enzimático *in vitro*, que dan alta especificidad y sensibilidad, permitiendo amplificar secuencias específicas de ADN, esta tecnología se basa en el uso de dos oligonucleótidos, luego de reconocer la secuencia complementaria en la molécula del ADN, ya que el ciclo se prolonga bajo la acción de la ADN polimerasa (Pedrosa, 1999).

II. ANTECEDENTES

Según Vicari *et al.* (2007) en su artículo investigativo “Evidence of canine Leptospirosis in Kennels in Sicily, by PCR method” indican que se seleccionaron al azar 64 perros recién capturados donde 40 eran machos y 24 hembras. Se buscó evidencia de ADN de Leptospirosis patógenas mediante un análisis de PCR dirigido al gen de ARNr 16S, la muestra de 24 hembras arrojó un resultado negativo mientras la muestra de los 40 machos bajo investigación arrojó un resultado de 5 casos positivos en la prueba de PCR para *Leptospira* spp. lo cual se asocia a una alta prevalencia de infección en machos.

Un estudio que realizó Lascano *et al.* (2017) de “Incidencia de Leptospirosis en perros que habitan en zonas cercana a la industria animal en Ecuador” mencionaron una prevalencia de leptospirosis de 8,1% \pm 1,5% en caninos callejeros estudiados con consumo de desechos de faenamiento en el área de influencia del camal, realizada en 252 caninos.

De acuerdo con Arroyo *et al.* (2011) en su trabajo de “Investigación *Leptospira* en animales portadores en la parroquia Calderón- Manabí”, analizado mediante la prueba de PCR en muestras de orina de ochenta y cuatro animales domésticos encontraron una positividad de 70% en caninos, 67% en porcinos y 34% en bovinos. Se obtuvo una secuencia de ADN de 19 amplicones (7 bovinos, 3 de caninos, 3 de porcinos) la gran mayoría de los cuales mostraron alta homología con *L. inadai* 16S rDNA.

III. JUSTIFICACIÓN

La Leptospirosis es una enfermedad zoonótica con alto poder de contagio, ya que se adquiere por contacto directo por medio de la orina de animales infectados, o bien, de forma indirecta en un ambiente contaminado. La Leptospirosis tiene una distribución mundial, afectando en gran medida las regiones tropicales y subtropicales.

Para ello se utilizará la Reacción en Cadena de la Polimerasa conocida como PCR, que es una técnica de laboratorio con una alta sensibilidad y especificidad, a partir de muestra de orina para confirmar o descartar la presencia de ADN de Leptospirosis en caninos.

Según Sosa (2015) Portoviejo es el cantón donde se encuentra la mayor concentración de casos de Leptospirosis en Manabí, considerando de suma importancia evaluar los factores de riesgo de esta enfermedad, debido a que esto nos permite determinar medidas de prevención y control donde la presentación de la *Leptospira* es endémica, como es el caso de Portoviejo. Por tanto, conocer la capacidad de eliminación de *Leptospira* que puede tener los caninos por la orina, puede ayudar a incentivar a los programas de control a través de información epidemiológica.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según Lujan *et al.* (2019) la Leptospirosis es un problema de salud pública, ya que esta enfermedad es zoonótica y de presentación mundial, observando que el único lugar donde no está presente la bacteria es en la Antártida, sin embargo, en regiones tropicales y subtropicales genera grandes problemas de salud, tanto a los animales domésticos como al ser humano.

Murcia *et al.* (2020) mencionan que los caninos juegan un papel importante en la transmisión de la Leptospirosis a las personas y a otros animales, ya que la enfermedad se transmite por contacto directo a través de la orina u otros fluidos corporales infectados, o bien, de manera indirectamente después del contacto con agua o suelos contaminados.

Según estudios hechos en Ecuador, existe una alta prevalencia de *Leptospira* spp en caninos domésticos, debido al inadecuado manejo y cuidado de los mismos por parte de sus dueños y por la elevada cantidad de caninos callejeros que sirven como fuentes de transmisión para la población en general (Chuva *et al.*, 2019).

De acuerdo con los resultados de Palma & Montalvo (2021) se realizó una investigación en el centro de faenamiento municipal del cantón Portoviejo donde se detectó el 5,3% de muestras positivas para *Leptospira* patógenas a través de la prueba diagnóstica PCR.

En la provincia de Manabí estudios de seroprevalencia demuestran la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* patógena, lo que hace suponer la exposición constante de los caninos a la bacteria, la importancia de saber la capacidad de eliminación que pueden tener estos animales, permite establecer nuevas líneas de investigación y normas de protección para evitar la infección al ser humano.

V. HIPÓTESIS

La infección por *Leptospira* en caninos en los cantones Manta, Portoviejo y Sucre es alta lo que ocasiona riesgos por su cercanía con la población humana.

VI. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la capacidad de eliminación de *Leptospira* patógena por orina a través de las características asociadas a la presentación de la infección en perros domésticos de los cantones Manta, Portoviejo y Sucre

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar la proporción de caninos eliminadores de *Leptospira* patógena en orina mediante la técnica de PCR convencional
- Identificar las características asociadas a la presencia de infección en caninos domésticos a través de una encuesta en los cantones Manta, Portoviejo y Sucre

VII. MARCO TEÓRICO

7.1 Aspecto Teórico

La Leptospirosis probablemente ha existido durante milenios, desde que el hombre entró en contacto con los animales silvestres, en particular los roedores. Adolf Weil, en 1886 describió cuatro casos de una enfermedad febril aguda caracterizada por ictericia, signos anormales en el SNC, hepatoesplenomegalia y disfunción renal. Por lo que se denominó enfermedad de Weil Brightman (2018). Los roedores fueron identificados, por primera vez, una fuente potencial de infección humana, seguidos por los perros, mientras que el papel del ganado como reservorio no se determinó hasta varias décadas después (Guerra , 2009).

Esta enfermedad es causada por una bacteria espiroqueta móvil del género *Leptospira*, que afecta a más de 160 especies de animales domésticos y silvestres que pueden padecer una afección de distinta gravedad o actuar como reservorios, este puede eliminar el microorganismo en la orina contaminando el ambiente sin mostrar signos clínicos de la enfermedad (Campos, 2014).

7.2 Leptospirosis

La Leptospirosis se encuentra distribuida mundialmente y es considerada como una de las enfermedades zoonóticas de mayor prevalencia global Romero *et al.* (2010), fue descrita por primera vez en el hombre en 1886 y en caninos en el año 1899 y recientemente ha recibido atención como causa importante de enfermedad hepática y renal (Uribe, 2016).

Los brotes ocurren normalmente durante la época de lluvia en zonas tropicales que son altamente inundables donde las condiciones para su transmisión son favorables Hernández *et al.* (2021). La mayoría de los mamíferos son portadores de al menos una especie de *Leptospira* ayudando a la mantención y transmisión de la infección (Céspedes, 2005).

7.3 Leptospira

La *Leptospira* son espiroquetas aerobias obligadas, gramnegativas, altamente móviles, estos organismos están fuertemente enrollados con extremos ganchudos característicos, midiendo alrededor de 0,1 a 0,2 μm de diámetro con una longitud de 6 a 25 μm , esta bacteria tiene una temperatura de crecimiento óptimo de 28 a 30°C y puede sobrevivir hasta 180 días en suelo húmedo por varios meses y en el frío puede sobrevivir hasta 100 días a -20°C (Azócar-Aedo *et al.*, 2014).

La vida de la *Leptospira* en aguas estancadas o de movimientos lentos proporciona un excelente hábitat para ellas, el rango de pH óptimo para la supervivencia es de 6,2 a 8,0 Guerra (2009). No toleran la exposición de forma directa a los rayos solares, no resisten pH ácidos o muy alcalinos, tampoco temperaturas extremas por lo que para su cultivación y crecimiento se necesita tener las condiciones adecuadas y los nutrientes necesarios para que ella se pueda desarrollar con éxito (Sheleby, 2007).

7.3.1 Clasificación

Pertenece a la familia Leptospiraceae, orden Spirochateales, que comprende dos especies fenotípicas: *L. interrogans* que comprende la cepa patógena causante de la leptospirosis y que, de acuerdo con sus características serológicas, se clasifican en serogrupos constituido por serovares y *L. biflexa* que comprende las cepas saprófitas, no patógeno, de vida libre, se encuentra en ambientes húmedo y aguas superficiales García *et al.* (2013). Según la clasificación molecular, se ha identificado 21 especies distribuida en tres grupos: especies saprofitas, especies patógenas y especies intermedias (Espinoza, 2014).

7.3.2 Epidemiología

Leptospira spp es capaz de infectar al ser humano, mamíferos domésticos y silvestre Lehmann *et al.* (2014), está presente en todos los continentes excepto en la Antártida. Los animales, incluidos los humanos, se pueden dividir en hospedadores primarios y secundarios Levett (2001). Un hospedero primario es aquel en el que la

enfermedad es prevalente y a menudo, asintomática. El hospedero secundario es aquel que muestra signos de enfermedad leve o grave cuando se infecta Arroyo (2011).

El agente se localiza en los túbulos renales y se excreta en la orina durante días, meses o incluso años Levett (2001). Los individuos infectados, ya sea animales o humanos, pueden permanecer asintomáticos y eliminar patógenos a través de la orina de por vida (Céspedes, 2005).

7.3.3 Reservorios

Distintos animales mamíferos están implicados en el ciclo de transmisión de la Leptospirosis, sin embargo, los reservorios naturales son los de mayor impacto, mamíferos silvestres o sinantrópicos pertenecientes al orden de los roedores Ko *et al.* (2019), los cuales mantienen una relación estrecha con las espiroquetas, ya que las transfieren a sus crías en el útero o en el periodo neonatal, los géneros sinantrópicos *Rattus* y *Mus* han sido identificados como los principales diseminadores de *Leptospira spp* debido a su notable capacidad de eliminar bacterias en su orina, además de compartir el hábitat y preferencias climáticas con las espiroquetas (Cosson *et al.*, 2014).

7.3.4 Transmisión

La transmisión de la infección por *Leptospira* ocurre por contacto de mucosas o piel erosionada con orina infectada, suelo, agua, alimento contaminado y también por la ingesta de tejidos infectados Sykes *et al.* (2010). Las mascotas pueden quedar expuestas a la *Leptospira* excretada por la orina de animales salvajes o de granja a través de actividades como nadar, beber o caminar sobre agua, suelo, lodos contaminados (Brown & Prescott, 2008).

7.3.5 Vías de transmisión

Esta bacteria puede transmitirse de manera horizontal y vertical:

La forma vertical se transmite desde la madre al embrión, feto, antes durante o poco después del parto. Los tipos de transmisión vertical en animales pueden ser:

transplacentarios, lo que se produce en el canal del parto o a través del calostro o leche (Rovid *et al.*, 2010).

La forma Horizontal se transmite de un animal infectado a un animal susceptible, independientemente de la relación parental de los individuos, puede ocurrir con contacto directo o indirecto: la forma directa se produce cuando el patógeno entra en contacto con la sangre, tejidos u órganos de un animal infectado a otros susceptibles, y de forma indirecta, siendo la más común; cuando la *Leptospira* proveniente de terrenos o aguas contaminadas por orina de animales enfermo, ingresan al organismo a través de la mucosa oral, conjuntival, nasal o genital (Tuemmers *et al.*, 2013).

7.3.6 Patogénesis

Esta bacteria se incorpora a un hospedero susceptible y se propaga rápidamente donde se penetran en el espacio vascular Ettinger (2006), irrumpen en el torrente sanguíneo produciendo una bacteriemia; con una veloz separación de invasión de diversos órganos por los cuales, algunos serovares tienen una peculiar predilección; entre ellos, las células de los parénquimas hepáticos, renales y pulmonares, así como por las células endoteliales de los capilares Linzitto *et al.* (2008). Los factores medioambientales más relevantes en la dinámica de transmisión de *Leptospira* spp. son: temperatura, humedad y precipitación pluvial (Torres *et al.*, 2015).

7.3.7 Signos Clínicos

El periodo de incubación de la Leptospirosis canina es de aproximadamente 5 a 15 días, la gravedad de los signos clínicos depende de la edad y la inmunocompetencia del animal, la serovariedad implicada y la virulencia de la bacteria. La enfermedad puede presentarse como hiperaguda, aguda, subaguda o crónico Langston & Heuter (2003), sin embargo, la mayoría de las infecciones no producen signos patognomónicos (Silva & Riedemann, 2007).

En la presentación sobreaguda la leptospiremia conduce a un rápido y progresivo deterioro del estado de salud, la Leptospirosis aguda presenta signos clínicos como fiebre, vómitos, deshidratación, taquipnea y shock que pueden ocurrir

tan rápidamente que la insuficiencia hepática o renal no tiene tiempo de desarrollarse (Cano, 2012). La Leptospirosis subaguda es la forma más diagnosticada y los signos clínicos incluyeron fiebre, anorexia, vómitos, deshidratación, letargo, dolor muscular, diarrea, coagulación comprometida, debido a compromiso hepático o vasculitis que puede conducir a petequias y/o equimosis. Eventualmente, puede desarrollarse una hepatitis crónica que provoca ictericia, encefalopatía hepática y pérdida de peso. La tos y la disnea también pueden ocurrir con conjuntivitis y amigdalitis. La poliuria y la polidipsia puede aparecer como consecuencia del deterioro progresivo de la función renal y/o insuficiencia hepática (Cano, 2012).

Los perros con Leptospirosis crónica pueden tener hepatitis crónica o fibrosis hepática y los signos incluyen anorexia, pérdida de peso, ascitis, encefalopatía hepática, ictericia (Chiani, 2013).

7.3.8 Factores de riesgo

Dentro de los factores de riesgo que se asocian para adquirir una infección por *Leptospira* spp, está el contacto directo con roedores, cuidado de animales domésticos como caninos, ganados y sistemas de recolección de agua de lluvia. Otro factor muy importante es la predisposición ocasionada por el riesgo laboral u ocupacional como agricultores, granjeros, trabajadores de los mataderos, cazadores (tramperos), veterinarios, leñadores, personas que trabajan en el alcantarillado y en arrozales (González *et al.* (2018). Las inundaciones y las fuentes de agua cerca de las viviendas son otro riesgo predisponente a la infección de *Leptospira*, ya que la orina de animales infectados, los suelos contaminados tienen contacto permanente con el ser humano (González *et al.*, 2018).

7.3.9 Diagnóstico

Se requieren pruebas diagnósticas específicas para confirmar o descartar el diagnóstico de Leptospirosis (Núñez *et al.* (2022). Estos métodos incluyen la detección de anticuerpos específicos por MAT y (ELISA) el Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (Iwamoto *et al.* (2009). Otras técnicas disponibles para el diagnóstico incluyen la observación por (DFM) Microscopia de Campo Oscuro, la prueba de (FA)

Anticuerpo Fluorescente, la Histopatología, el Cultivo bacteriológico y la (PCR) Reacción en Cadena de la Polimerasa (Núñez *et al.*, 2022).

Las técnicas moleculares más utilizada son las que se realizan mediante la detección de genes propios de especies patógenas; siendo rápida, sensible y específica pudiendo utilizarse para la identificación de la enfermedad en estadios temprano (Sedano, 2014).

La PCR es un método directo, es una ingeniosa técnica que permite obtener millones de copia de cualquier fragmento de DNA en pocas horas, al igual que ocurre en las células invitro, pero se utiliza un ADN polimerasa muy especial en el tubo de ensayo. La Taq DNA polimerasa esta enzima proviene de una bacteria llamada *Thermus aquaticus* que vive en las aguas termales del parque nacional de Yellowstone en Estados Unidos, la estrategia de este método se basa en generar cambios bruscos pero muy moderados en la temperatura, de manera que primero se incrementa para provocar la división de las dos cadenas DNA para que puedan replicar. La PCR también se usa ampliamente a nivel clínico para detectar enfermedades virales (Cortés *et al.*,2002).

7.3.10 Medidas de control

Debido a su impacto zoonótico, las medidas de prevención de esta enfermedad no solo están dirigidos hacia la vacunación de las mascotas caninas, sino también hacia campañas de control de roedores y de otros animales silvestres que participan en la diseminación de la enfermedad. A estos programas se le suman el control en el consumo de aguas estancadas que comúnmente están contaminadas. Existen diversos tipos de vacunas comerciales contra *Leptospira*, entre las que se encuentran las que contienen dos serovares la Canicola e Icterohaemorrhagiae combinados con vacunas virales. El programa de vacunación para caninos comienza a las 9 semanas de edad, siguiendo una segunda dosis a las 12 semanas y una tercera a las 15 semanas, con una revacunación cada 6 u 8 meses (Romero,2014).

7.4 Leptospirosis en caninos

La Leptospirosis afecta con mayor frecuencia a perros adultos. La gravedad de la infección varía en función de la edad, entorno y cepa de *Leptospira*. Las infecciones agudas se caracterizan por fiebre y debilidad muscular. Los síntomas más frecuentes asociados a la Leptospirosis incluyen letargia, depresión, anorexia, y vómitos. Otros síntomas son: pérdidas de peso, dolor no localizado, dolor articular, parálisis posterior y dificultad respiratoria (Schaer, 2006).

Los caninos que sobreviven al tipo icterico o que ya no manifiestan la fase septicémica de la patología deja de estar presente en el hígado para afectar a los riñones, presentando signos de insuficiencia renal, variando su gravedad y acelerando su progresión, normalmente la tasa de sedimentación está muy elevada, y la orina contiene albúmina, cilindros, hematíes y leucocitos; el deceso puede sobrevenir por fallo renal debido a una nefritis difusa o aguda. Las otras variaciones encontradas son las del síndrome urémico (Goldstein, 2010).

Debido a su comportamiento natural de extravío existe mayor probabilidad de contraer *Leptospira* en los perros machos que en las hembras, de igual forma los caninos que tienden a tener mayor y/o libre contacto con el medio exterior a diferencia de los perros que están solo en casa, corren mayor riesgo de infectarse. Además, los perros que deambulan libremente o viven por zonas urbanas y suburbios de las ciudades son una fuente importante de transmisión de la infección por tener contacto con reservorios silvestres y roedores (Azócar-Aedo *et al.*, 2014).

En la provincia de Manabí, estudios enfocados en el cantón Portoviejo demuestran una elevada seroprevalencia de 12,6% a 39% de *Leptospira*, que fueron reportadas en caninos domésticos (Velásquez *et al.*, 2020; Carreño *et al.*, 2013), atribuyendo el contacto de los caninos con poblaciones de ratas, acompañado de condiciones climáticas y de ecosistema que favorecen su presencia, tal como lo afirma Sosa (2015), que la *Leptospira* se encuentra altamente presente en algunas regiones costeras de Ecuador donde identifico especies de *Leptospira* en orina de cerdos ,porcinos, bovinos, riñones de ratas y muestras de aguas.

De acuerdo Pesantez & Aguilar (2021) notificaron datos sobre el número de casos de *Leptospira* en Latinoamérica en caninos, donde se reportaron en Brasil (0,2%) Perú (23,6%) y Colombia (8,8%) durante el año 2017.

Según Alonso (2020) en su estudio serológico realizado en Colombia, demostró que existe una prevalencia alta (79,9%) en *Leptospira*, los serogrupos más frecuentes fueron, *Grippotyphosa* (10,2%), *Hursbrige* (8.4%), *Saimin* y *Australis* (7.2%), *Canicola* (6.8%), *Tarassovi* (6.4%).

A nivel de Ecuador, Guayaquil es la ciudad con más altos casos de incidencia de *Leptospira cania*, mientras Cuenca y Quito tiene una incidencia moderada y Loja una incidencia baja (Pesantez & Aguilar, 2021).

VIII. DISEÑO METODOLÓGICO

8.1 Tipo de estudio

El presente trabajo fue de tipo transversal No probabilístico a partir de muestras de orina recolectadas de caninos aparentemente sanos de los cantones Manta, Portoviejo y Sucre de la Provincia de Manabí que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión.

8.2 Criterios de inclusión

- Animales aparentemente sanos provenientes de clínicas veterinarias y/o Centros de rescates
- Que no hayan recibido antibióticos durante 4 semanas antes del muestreo
- Perros de zonas urbanas y rurales de los cantones Manta, Portoviejo y Bahía
- Que hayan sido o no vacunados contra *Leptospira*

8.3 Cálculo de muestra

Para el cálculo del tamaño de la muestra se utilizó la fórmula para proporción de población desconocida establecida por Thrusfield (2018), asumiendo un nivel de confianza del 95% una prevalencia esperada de 26% y un error aceptado del 5%, alcanzando un tamaño de muestra de 298 caninos, repartidos en los 3 cantones antes indicados.

8.4 Recolección y procesamiento de la muestra de orina

Las muestras de orina fue extraídas a través de sonda uretral directamente de la vejiga del animal con la ayuda de una jeringa estéril, siguiendo el protocolo establecido en el trabajo investigativo *Leptospira patógenas presente en animales domésticos y silvestres de tres cantones de la provincia de Manabí: Características genómicas, dinámica de eliminación y su distribución en el ambiente* aprobado por el Comité de Bioética institucional –UTM y asentado en el Tomo:021-2 Folio:21-2-4; Las muestras de orina fueron sometidas a un proceso de estabilización y concentración

siguiendo el protocolo establecido por Stoddard (2013) que consistió en lavado con tampón fosfato salino (PBS), una vez estabilizada la muestra fue conservada a -20°C.

Las muestras de orina, estabilizadas en PBS fueron sometidas a un protocolo de extracción descrito por Matamala (2018) el cual consistió en utilizar 500 ul de buffer de lisis que contiene EDTA, SDS, TRIS y ClNa y 5 uL de proteinasa K y sometidas a una incubación por una hora a 56°C con la ayuda de un termoblock, después de ese tiempo se aplicó etanol al 100% para provocar precipitación del ADN.

Las muestras, extracciones de ADN y PCR fueron procesados en el laboratorio de Leptospira de la Universidad Técnica de Manabí ubicados en la parroquia Lodana Cantón Santa Ana.

8.5 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

El ADN obtenido fue analizado mediante PCR convencional, dirigido por lip L32 siguiendo el protocolo descrito por Branger *et al.* (2005), utilizando un juego de Primers o cebadores específicos para *Leptospira* patógenas descritos en la tabla 1. El cual identifica 262 pares de bases (pb), el protocolo de la PCR incluyó controles: positivo (cultivo de *Leptospira*) y negativo (mix de PCR). La concentración de los reactivos para el master mix se encuentran descritos en la tabla 2. El perfil térmico que se utilizó fue el siguiente: desnaturalización inicial 95 °C durante 5 min, desnaturalización de 94 °C durante 15 segundos, alineamiento a 56 °C durante 35 segundos, extensión a 72 °C durante 40 segundos y una extensión final a 72 °C durante 10 min.

Tabla 1: Cebadores contra *Leptospira* patógenas usada en el PCR

Primers / cebador	Secuencia
<i>hap1</i> F (5' a 3')	GCA AGC ATT ACC GCT TGT GG
<i>hap1</i> Reverse (5' a 3')	TGT TGG GGA AAT CAT ACG AAC

Tabla 2: Concentración de reactivos del master mix

Reactivo	Concentración final	Volumen por reacción (μL)
Primer F	0,2μM	1,25
Primer R	0,2μM	1,25
MgCl ₂	1,5 mM	0,75
Buffer	1X	2,50
H ₂ O		13,55
Taq polimerasa	1U	0,20
dNTPs	0,2mM	0,50
TOTAL		20,00

8.6 Gel de electroforesis.

Se realizó en gel de agarosa al 1,5% y los productos de PCR fueron teñidos y cargadas con buffer de carga 6X y SYBR Safe y sometidas a 100 voltios por un tiempo aproximado de 40 minutos.

8.7 Aplicación de encuesta epidemiológica

Se aplicó una encuesta epidemiológica descrita en el anexo1, la cual buscó identificar las características de habitad, manejo del perro y relacionarlas con la positividad o negatividad a la PCR.

8.8 Análisis estadístico

A partir de los resultados a la PCR se realizó la prueba de Fisher para establecer diferencias estadísticas entre las proporciones de las características de los animales positivos y negativos identificadas en la encuesta epidemiológica, utilizando un nivel de significancia $\leq 0,05$, se aplicó estadística descriptiva en el procesamiento de características como procedencia, raza, sexo entre otras.

IX. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

De acuerdo con el trabajo de investigación realizado se obtuvieron los siguientes resultados.

9.1 Característica de los animales seleccionados de acuerdo con la raza.

De un total de 298 muestras de orina el 58,72 % (175) provenían de caninos mestizos y el 41,27 % (123) de razas conocidas (ver tabla 3).

Tabla 3: Porcentaje de caninos por raza utilizados en el estudio

Raza	Muestras	Porcentaje
Razas	123	41,27
Mestizo	175	58,72
Total	298	100,00

9.2 Característica de los animales seleccionados de acuerdo al Sexo

De un total de 298 muestras de orina, el 21,14% (63) provenían de caninos hembras, mientras que el 78,85% (235) de caninos machos ver (tabla 4).

Tabla 4: Características por sexo de los caninos muestreados en el estudio.

Sexo	N	Porcentaje
Hembras	63	21,14
Machos	235	78,85
Total	298	100,00

9.3 Característica de los animales seleccionados de acuerdo con la Edad

Se observó que el 33,22% (99) de los individuos muestreados presentaban entre un mes a un año, de tal manera que el 66,75% (199) correspondían a caninos mayores de un año (ver tabla 5).

Tabla 5: Características por edad de los caninos seleccionados para el estudio

Edad-Años	N	Porcentaje
0-<1 año	99	33,22
>1-2 años	9	3,02
> 2 – 6 años	123	41,27
> 6 años	67	22,48
Total	298	100,00

9.4 Característica de los animales seleccionados de acuerdo con su procedencia

De los 298 caninos muestreados el 79,1% (236) pertenecen al cantón Portoviejo; el 18,45% (55) a Manta; el 2,34% (7) a Sucre (ver tabla 6).

Tabla 6: Porcentajes de cantones seleccionados en el estudio.

Cantones	N	Porcentaje
Portoviejo	236	79,19
Manta	55	18,45
Sucre	7	2,34
Total	298	100,00

9.5 Característica de los animales seleccionados de acuerdo a su procedencia

De acuerdo a la procedencia, el 4,69% de los caninos correspondían a centros comunitarios de Rescate, mientras que el 79,19% pertenecían a hogares fijos (ver tabla 7).

Tabla 7: Características de los caninos seleccionados para el estudio de acuerdo a su ambiente de crianza.

Ambiente de crianza	N	Porcentaje
Centro de Rescate	14	4,69
Con propietarios	236	79,19
Desconocido	48	16,10
Total	298	100,00

9.6 Prevalencia de *Leptospira* patógena por medio de PCR convencional en perros de la provincia de Manabí

Se observó un 2,01% (6/298) de positividad de ADN de *Leptospira* patógena en los caninos muestreados de los cantones Manta, Portoviejo y Sucre (ver tabla 14).

Tabla 8: Total de caninos Positivos a la PCR

Resultados PCR	N	Porcentajes
Positivo	6	2,01
Negativo	292	97,98
Total	298	100,00

9.7 Encuesta epidemiológica realizada de acuerdo al resultado obtenido por PCR

Al evaluar el total de casos positivos a *Leptospira* patógena de los caninos muestreados por medio del PCR convencional, el 1,8% pertenece a Manta mientras que el 2,1% a Portoviejo, no se observó positividad en los animales muestreados del cantón Sucre; en relación con la raza se observó que 1,7% eran mestizo y 2,4 % raza; el 3,1% fueron hembras y el 1,7% fueron machos, no observando diferencia significativa entre las proporciones de positivos y negativos en estas características (ver tabla 9).

El 2,5% pertenecían a caninos con dueño a diferencia de los animales muestreados en centros de rescate donde no se observó ningún resultado positivo. Identificando que no hay diferencias significativas entre las proporciones (ver tabla 9).

La característica de los animales muestreados al tener contacto con aguas estancadas, se identificó una mayor proporción de casos positivos a la PCR en caninos que no tenían contacto con 2,6% en comparación con los que habían tenido contacto; al evaluar el antecedente de contacto con Basura, el 1,5% de los positivos al PCR tenía antecedentes de contacto, en comparación con los que no tuvieron contacto a basura que presentaron un 2,7% de positividad. Al evaluar el contacto con roedores no se halló diferencias entre las proporciones, sin embargo, se identificó que los que no

reportaron contacto con roedores presentan mayor proporción de casos positivos a la PCR con el 2,7% (ver tabla 9).

En cuanto al antecedente de vacunación y positividad al PCR el 1,9% tiene antecedente de vacunación y un 3% no tiene antecedente de vacunación a *Leptospira* patógena, sin embargo, se puede evidenciar que del total de animales vacunados el 11,1% había recibido una vacuna dentro de seis meses anteriores al muestreo; 1,7% tenía entre seis a doce meses; y el 3 % se desconocía fecha de vacunación. Se halló que no hay diferencia significativa entre la ocurrencia de positividad al PCR entre animales vacunados y no vacunados (ver tabla 9).

Se observó que 3,7% de los caninos realizan sus excretas en su domicilio mientras el 2% en casa o lugares públicos, evidenciando que no hay diferencia entre las proporciones de casos positivos al PCR (ver tabla 9).

Del total de casos positivos a *Leptospira* patógena el 2,9% de los individuos están entre una edad mayor a 6 años; el 11,1% de uno hasta dos años y el 3% menor a un año, no observado diferencia en la ocurrencia de la positividad de acuerdo a la edad al PCR (ver tabla 9).

Tabla 9: Característica de los animales positivos a la PCR de Leptospiras Patógenas en caninos de la provincia de Manabí.

Variable	característica	Positivos (%)	Negativos (%)	IC 95%	P value
Tiempo de Vacunación contra Leptospira	<6 meses	1 (11,1)	8(88,9)	-9,4 - 31,6	0,2484
	>6- 12 meses	2 (1,7)	115 (98,3)	-0,6 - 4,0	
	>12- 24 meses	0 (0)	10(100)	0	
	>24-36 meses	0 (0)	4(100)	0	
	Desconocido	3 (1,8)	155(98,2)	-0,2 - 4,0	
Vacunas contra Leptospira	Vacunado	3 (1,9)	149 (98,1)	-0,2 - 4,1	0,6817
	No vacunado	3 (3,0)	95 (97,0)	-0,3 - 6,4	
	Desconocido	0 (0)	48 (100)	0	
Cantones	Portoviejo	5 (2,1)	231 (97,9)	0,2- 3,9	1
	Manta	1 (1,8)	54(98,2)	-1,7 - 5,3	
	Sucre	0(0)	7(100)	0	
Edad	0-1 año	3 (3,0)	96 (97,0)	-0,3 - 6,4	0,3345
	1-2 años	1(11,1)	8 (88,9)	-9,4 - 31,6	
	≥2años	0 (0)	123(100)	0	
	≥ 6 años	2 (2,9)	65(97,1)	-1,0 - 7,0	
Sexo	Hembra	2(3,1)	61(96,9)	-1,1 - 7,5	0,6101
	Macho	4 (1,7)	231(98,3)	0,04 - 3,3	
Roedores	Contacto	0(0)	30 (100)	0	0,6965
	No contacto	6(2,7)	214 (97,3)	0,5 - 4,8	
	Desconocido	0 (0)	48(100)	0	
Raza	Mestizo	3(1,7)	172 (98,3)	-0,2 - 3,6	0,6937
	Razas	3(2,4)	120 (97,6)	-0,2 - 5,1	
Ambiente de crianza	Centro de Rescate	0 (0)	14(100)	0	0,6965.
	Con Propietario	6(2,5)	230 (97,5)	0,5 - 4,55	
	Desconocido	0 (0)	48 (100)	0	
Basura	Contacto	1(1,5)	65(98,5)	-1,4 - 4,4	1
	Sin contacto	5 (2,7)	179 (97,3)	0,3 - 5,0	
	Desconocido	0(0)	48(100)	0	
Aguas estancadas	Contacto	0(0)	24(100)	0	0,7561.
	Sin contacto	6(2,6)	220 (97,4)	0,5 - 4,7	
	Desconocido	0(0)	48(100)	0	
Lugar excretas	Calle	0 (0)	24 (100)	0	0,6684
	Domicilio	3 (3,7)	77 (96,3)	-0,4 -7,9	
	Ambas	3 (2,0)	143 (98,0)	-0,2 - 4	
	Desconocido	0 (0)	48 (0)	0	

X. DISCUSIÓN

La *Leptospira* es una bacteria de alta prevalencia en zonas tropicales y subtropicales con una distribución muy alta en todo el mundo, siendo el canino doméstico uno de sus diseminadores ambientales principales. Las condiciones tropicales del Ecuador, especialmente en las zonas costeras, y la abundante población canina favorecen la propagación y permanencia de la bacteria en este entorno. Siendo la PCR el método más eficaz para identificar la *Leptospira* en orina de acuerdo con Bolín, (1996), debido a su alta sensibilidad y especificidad en orina que de acuerdo con Aldazabal *et al.* (2007) es de un 100%, considerándola como una prueba “Gold estándar”.

El presente estudio, mostró una prevalencia baja a *Leptospira* patógena a través de PCR convencional, similares resultados fueron observados por Zaidi *et al.* (2018) en Estados Unidos con una prevalencia 4,8 %. Contrario a estos estudios Mito *et al.* (2018) y Putro *et al.* (2016) reportaron prevalencias superiores del 10,3% y 13,8% en Brasil y en Semarang respectivamente. La diferencia de estos estudios radica en la utilización de diferentes primers objetivos para el diagnóstico de *Leptospira* patógena (gen 16S rRna,rrs y hsp; lipL32; Lepa 1 y Lepa 2) y técnicas de PCR (PCR convencional y PCR en tiempo real), sin embargo en estos últimos estudios, los caninos muestreados, pertenecían a situación de calle, suburbios y de refugios públicos lo que ocasionaba que fueran más propensos a infectarse, en comparación con el presente estudio realizado en la provincia de Manabí que el 84% de los animales muestreados tenían propietarios, otros aspectos a considerar son las prevalencias existentes de Leptospirosis en Semarang que podrían presumir mayor positividad a *Leptospira* en el ambiente.

En el presente estudio manifestó mayor casos de positividad a la PCR en animales con propietarios y no se observó positividad en animales de centros de rescates, contrario a lo reportado por Altheimer *et al.* (2020) y Rojas *et al.* (2010) quienes observaron mayor frecuencia de positividad a *Leptospira* patógena en perros

de situación de calle y en caninos en centros de rescates en comparación a los que tenían dueños; estos resultados pueden deberse a que aunque en Manabí los propietarios de mascotas indican tener control sobre ellos, muchos de estos tienen vida libre o momentos que no son controlados por los dueños, lo que aumentaría la posibilidad de entrar en contacto con la bacteria que se encuentra libremente en el medio ambiente tal como lo demuestra Sosa (2015) donde identificó la presencia de *Leptospira* en muestra de agua, en orina de cerdo, bovino y rata en un estudio piloto en el cantón Portoviejo de la provincia de Manabí .

Cuando se evaluó la presentación de positividad de acuerdo al sexo, no se observó diferencia significativa al PCR de *Leptospira* patógena en machos y hembras, resultados similares a los encontrados en este trabajo fueron reportados por Zaidi *et al.* (2018) y diferentes fueron reportados por Altheimer *et al.* (2020) donde observo una mayor frecuencia en hembras que en machos utilizando PCR en tiempo Real. Estos resultados pudieron deberse a que el tamaño de muestra de macho fue superior en comparación a las hembras y otra posible causa, podría deberse a que la *Leptospira* infecta a los caninos sin diferenciar al sexo, debido a que la bacteria puede permanecer viable en el medio ambiente durante semanas o meses, tal como lo menciona Botero & Rodríguez (2014).

En cuanto a la vacunación, no se evidenció diferencia significativa de positividad a la PCR en animales vacunados y no vacunados, resultados diferentes fueron reportados por Blanchard *et al.* (2021) que afirma que los perros vacunados contra *Leptospira* no mostraron presencia de esta bacteria en orina, demostrando protección en los animales vacunados frente a los que no reciben vacuna contra *Leptospira*. Estas diferencias encontradas en los resultados del presente estudio, pueden deberse a que los propietarios de las mascotas no estaban al día con el plan de vacunación, generando una mayor susceptibilidad a la bacteria por no tener inmunidad pasiva contra el patógeno, Klassen *et al.* (2003) menciona que al vacunar dos veces al año a los caninos contra *Leptospira* canina puede dar una mayor protección de hasta 13 meses después de la última aplicación.

No se observó diferencias entre las proporciones de positivos al PCR que tuvieron contacto con aguas estancadas, contrario a lo observado por Muñoz (2014) donde encontró que existe mayor positividad en aguas estancadas como charcos, bebederos evaluado por PCR en tiempo real. Estos resultados podrían deberse al inadecuado sistema de alcantarillados sanitarios común en Manabí, existiendo cantones que no cuentan con los mantenimientos adecuados, incrementando así, el riesgo de contaminar las aguas con orina de animales infectados (Levett,2001).

En cuanto al contactos con roedores, no hubo diferencia significativa de positividad al PCR de *Leptospira*, contrario a los resultados obtenidos por Tostes *et al.* (2012) que encontró que la positividad a *Leptospira* aumentaba de acuerdo en caninos que presentaban mayor contacto con estos animales. Estos resultados podrían deberse al contacto indirecto que tenían los caninos, en su mayoría de traspatio, a pesar de que los dueños aseguraban que sus mascotas no tenían contactos con roedores, tal cual lo menciona (Concha, 2021).

Cuando comparamos las prevalencias del presente estudio con prevalencias en otras especies animales, observamos que son similares a las reportadas por Montalvo & Palma. (2021) en bovinos sacrificados en el centro de faenamiento de Portoviejo con el 5,3 % (4/75) de positividad a *Leptospira* patógena por PCR; en ambos estudios se trabajó con el mismo gen Hap 1 para *Leptospira* patógena, la única diferencia que las unidades diagnósticas de este último estudio fue realizado a través de muestras agrupadas. Estos resultados son de importancia para la salud pública debido a que los caninos aumentan el riesgo de infección, ya que el perro es un huésped reservorio de la bacteria, lo que posibilita la diseminación de *Leptospira* en los pastos, alimento balanceado y en las instalaciones de criaderos, sin embargo, los caninos son precisos para compañía y vigilancia de hatos de bovinos según (Benavides & Marcillo , 2016)

En cuanto a la Raza y Edad de los animales positivos no se observaron diferencia significativa de positividad al PCR, similares resultados fueron reportados por Tostes *et al.* (2012) pero diferentes en relación a la edad reportados por Zaidi *et al.* (2018) donde observó que los perros jóvenes menores de un año se enfrentan a un riesgo significativamente mayor de infectarse a *Leptospira* patógena que los caninos mayores a un año.

XI. CONCLUSIONES

Los caninos muestreados en el presente trabajo pueden eliminar *Leptospira* patógena mediante la orina, ya que la prueba de PCR convencional permitió detectar a través del gen lipL32 (HAP1) una prevalencia de ADN en caninos provenientes de los cantones Manta, Portoviejo y Sucre.

Se observó que los animales con dueños presentaron mayor positividad a PCR para *Leptospira* patógena.

No se observó asociación entre las características sexo, edad, raza, contacto con roedores, aguas contaminadas y procedencias de los animales positivos a la PCR de *Leptospira* patógena, concluyendo que la bacteria se encuentra diseminada en el ambiente donde se desenvuelven los animales domésticos siendo un riesgo eminente de transmisión para el ser humano.

XII. RECOMENDACIONES

Se debería instruir tanto en lugares rurales como urbanos al conocimiento sobre esta bacteria, debido a que la infección en los perros constituye un riesgo potencial de transmisión al ser humano.

La vacunación de los caninos se debe realizar cada seis meses porque la *Leptospira* posee un gran impacto en la salud pública y así podemos llegar a prevenir que la mascota este vulnerable a la bacteria.

Es recomendable continuar realizando nuevas investigaciones con esta técnica diagnóstica para poder comprender la epidemiología de esta patología en los animales domésticos y silvestres de la provincia de Manabí.

XIII. PRESUPUESTO

Rubro	Cantidad	Precio	Total
	Unidades	Unit.	USD
Materiales de laboratorio			
Jeringas	300	0,15	45,00
Mascarillas	3	0,30	\$90
Sondas	300	0,40	\$120
Guantes de manejo	6	12,00	72,0
Materiales de laboratorio PCR	1	700,00	700,00
Subtotal			1027,00
Total			1027,00

XIV. CRONOGRAMA

Actividades	2021									
	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Julio.	Ago.	Sep.	Nov.	Dic.	
Elaboración				X	X					
Aprobación del proyecto					X					
Compra de materiales						X	X			
Recolección de muestras								X	X	
Actividades	2022									
	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Ago.	Sep.	
Recolección de muestras	X	X								
Procesamiento de muestras en el laboratorio		X	X	X						
Análisis de muestras				X						
Presentación de informe final									X	

XV. BIBLIOGRAFIA

- Brightman, C. (2018). *Leptospirosis: a leisure and occupational hazard*. TRENDS IN UROLOGY & MEN'S HEALTH. Obtenido de <https://wchh.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/tre.619>
- Cosson, J.-F., Picardeau, M., Mielcarek, M., Tatardo, C., & Chaval, Y. (2014). *Epidemiología de Leptospira Transmitida por Roedores en el Sudeste Asiático* (Vol. 8). PLoS Negl Trop Dis. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002902>
- Lehmann, J., Matthias, M., Vinetz, J., & Fouts, D. (2014). *Leptospiral pathogenomics*. (Vol. 3). Pathogens. doi:10.3390/pathogens3020280
- Schaer, M. (2006). *Medicina clínica del perro y el gato*. Barcelona : Elseiver .
- Aldazabal, J., Balda, L., Céspedes, M., Condori, P., González, D., Munayco, F., . . . Tapia, R. (2007). *VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE PCR PARA EL DIAGNOSTICO DE LEPTOSPIROSIS EN MUESTRAS DE SANGRE Y ORINA*. Obtenido de https://bvs.ins.gob.pe/insprint/cindoc%20/INFORMES_TECNICOS/69.pdf#:~:text=Leptospirosis.%20Las%20t%C3%A9cnicas%20moleculares%20son%20altamente%20sensibles%20y,una%20t%C3%A9cnica%20que%20permite%20incrementar%20el%20n%C3%BAmero%20de
- Alonso, M. (2020). *Leptospirosis canina y su importancia Diagnostica*. colombia: Universidad Cooperativa de Colombia. Obtenido de https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/20251/2/2020_AlonsoForero_leptospirosis_canina_y_su_importancia_diagnostica.pdf
- Alzheimer, K., Jonwattanapisan, P., Luengyosluechakul, S., Pussonthornthum, R., prapasarakul, N., Kurilung, A., . . . Pantchev, N. (2020). *Infección y excreción de leptospira e perros en Tailandia* (Vol. Volumen). BMC Veterinary Research. doi:<https://link.springer.com/article/10.1186/s12917-020-2230-0>

- Arroyo, M. (15 de Julio de 2011). *Investigación de Leptospira en animales portadores en la parroquia Calderón - Manabí*. Obtenido de file:///C:/Users/User1/Downloads/101055%20(1).pdf
- Avilés, M., Sandoval, E., Motesinos, R., Montalvo, M., & Tejeda, A. (2018). A comparative study of the diagnosis of leptospirosis by PCR and MAT in northwestern Mexico. *Acta Universitaria* , 28(4), 50-55. Obtenido de <https://www.redalyc.org/jatsRepo/416/41657172017/html/index.html>
- Azócar-Aedo, L., Smits, H., & Monti, G. (2014). *Leptospirosis in dogs and cats: epidemiology, clinical disease, zoonotic implications and prevention* (Vol. 46). Chile: Arch Med Vet. Obtenido de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/amv/v46n3/art02.pdf>
- Benavides, K., & Marcillo , A. (2016). *SEROPREVALENCIA DE Leptospira spp EN CANINOS DE FINCAS LECHERAS EN EL MUNICIPIO DE PASTO, COLOMBIA*. Obtenido de <https://revistas.udenar.edu.co/index.php/revip/article/view/2428/3545>
- Blanchard, S., Cariou, C., Bouvet, J., Valfort , W., Oberli , F., Villard, S., . . . Saint-Vis, B. (2021). *Quantitative Real-Time PCR Assays for the Detection of Pathogenic Leptospira Species in Urine and Blood Samples in Canine Vaccine Clinical Studies: a Rapid Alternative to Classical Culture Methods*. Obtenido de <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/JCM.03006-20>
- Bolin , C. (1996). *DIAGNOSIS OF LEPTOSPIROSIS: A REEMERGIN DISEASE OF COMPANION ANIMALS*. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8942213/>
- Botero, A., & Rodriguez, G. (2014). *DETECCION DE LEPTOSPIRA SPP. EN ORINA DE CANINOS EXPUESTOS A FACTORES DE RIESGO MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE LA TÉCNICA MOLECULAR PCR*. Obtenido de https://ciencia.lasalle.edu.co/maest_ciencias_veterinarias/37/
- Branger, C., Blanchard, B., Fillonneau, C., Suard, I., Aviat, F., Chevallier, B., & André-Fontaine, G. (2005). *Polymerase chain reaction assay specific for*

pathogenic Leptospira based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. . FEMS Microbiol Lett, 243(2), 437-445.: doi:10.1016/j.femsle.2005.01.007.

Brown , K., & Prescott, J. (2008). *Leptospirosis in the family dog: a public health perspective.* (Vol. 178). CMAJ. doi:10.1503/cmaj.071097

CAMJ. (2008). CANINE LEPTOSPIROSIS IN CANADA: A VETERINARIANS PERSPECTIVE. *Public Health*, 399. Obtenido de <https://www.cmaj.ca/content/cmaj/178/4/397.full.pdf>

Campos, N. (Diciembre de 2014). Leptospirosis. 31. Obtenido de https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152014000200012#:~:text=La%20leptospirosis%20humana%20es%20una%20transforman%20en%20portadores%20asintom%C3%A1ticos.

Cano, C. (2012). *Caso clínico de Leptospirosis en un canino.* Caldia -Atoquia: Corporación Universitaria Lasallista. Obtenido de http://repository.unilasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/689/1/CASO_CLINICO_LEPTOSPIROSIS_CANINO.pdf

Céspedes, M. (2005). *Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Emergente* (Vol. 22). Lima: Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica. Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342005000400008

Chiani, Y. (2013). *Desarrollo y validación de técnicas diagnosticadas de leptospirosis Canino.* Esperanza- Argentina: Facultad de ciencias veterinarias Esperanza. Obtenido de <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/434/Tesis.%20Chiani%20Yosena.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

Chuva, P., & Yunga, J. (25 de Febrero de 2019). Seroepidemiología y análisis espacial para caracterizar los factores de riesgo para leptospirosis canina en las haciendas y tres comunidades de Tarqui. Obtenido de

<http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/32044/1/Trabajo%20de%20titulaci%c3%b3n.pdf>

Concha, C. (2021). *DETECCIÓN DE LEPTOSPIRA PATÓGENA EN MUESTRAS DE SUELO DE 6 HOGARES DE LA ZONA RURAL DEL CANTÓN ROCAFUERTE EN LA PROVINCIA DE MANABÍ*. Obtenido de <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/10597/1/136793.pdf>

Cortés, E., & Morcillo, G. (2002). *Ingeniería genética manipulación de genes y genomas*. Madrid: Sakefat.S,L. Obtenido de <file:///C:/Users/User1/Downloads/PCR.pdf>

Espinoza, L. (2014). *Leptospirosis una de la mayores zoonosis del Ambiente*. Obtenido de <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2014/2013-CHA-Leptospirosis-HON-L-Espinoza-1.pdf>

Ettinger, S. (2006). *Tratado de medicina interna de veterinaria: enfermedad del perro y gato*. Elseiver.

García, R., Reyes , A., Basilio, D., Ramírez, M., & Rivas , B. (2013). *Leptospirosis; un problema de salud pública* (Vol. 60). México : Rev Latinoamer Patol Clin. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2013/pt131g.pdf>

Goldstein, R. (29 de Mayo de 2010). Obtenido de <https://es.scribd.com/document/349722378/CASO-CLINICO-LEPTOSPIROSIS-CANINO-pdf#download>

González , A., Monrroy, A., & Filippo, G. (2018). *Factors associated with leptospira infection: a review of literature* (Vol. 10). Boyacá: Ciencia y Salud Virtual. Obtenido de <file:///C:/Users/User1/Downloads/Dialnet-FactoresAsociadosALaInfeccionPorLeptospira-6732640.pdf>

Guerra , M. (2009). *leptospirosis* (Vol. 234). VeterinarioMedicinaHoy dia:zoonosisActuali. doi:<https://avmajournals.avma.org/view/journals/javma/234/4/javma.234.4.472.xml>

- Hernández, P., Pabón, L., & Rodríguez, M. (2021). Leptospirosis a zoonosis that impacts health: diagnosis, treatment and new alternatives of control. *Revista Cubana de Medicina Tropical*.
- Iwamoto, E., Wada, Y., Fujisaki, Y., Umeki, S., Jones, M., & Mizuno, T. (2009). *Nationwide Survey of Leptospira Antibodies in Dogs in Japan: Results from Microscopic Agglutination Test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Vol. 71). Tokyo: J Vet Med Sci. Obtenido de https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/71/9/71_9_1191/_pdf/-char/en
- Ko, A., Goarant, C., & Picardeau, M. (2019). *Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen*. (Vol. 7). *Nat Rev Microbiol*. doi:10.1038/nrmicro2208
- Langston, C., & Heuter, K. (2003). *Leptospirosis A re-emerging zoonotic disease* (Vol. 33). New York: *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. doi:10.1016/s0195-5616(03)00026-3
- Lara, D., Méndez, W., Moscoso, J., & Chavarría, L. (2015). Leptospiras: Revisión del agente causal de una enfermedad zoonótica. *Dianelt*, 10(2), 65-80. Obtenido de https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjB5ZL0-PHxAhWDsDEKHaV3CMoQFjABegQIBhAD&url=https%3A%2F%2Fdialnet.unirioja.es%2Fdescarga%2Farticulo%2F5460360.pdf&usg=AOvVaw3V_kVbBlqlWogIqlO0X2h4
- Lascano, P., Arcos, C., López, G., Méndez, M., Soria, M., & Vallecillo, A. (2017). Incidencia de leptospirosis en perro que habitan en zonas cercana a la industria animal en Ecuador. *Ecuatoriana de Ciencias Animal*, 1(2). Obtenido de <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjVx-jUfTxAhXYRDABHUmaCucQFjAAegQIAxAD&url=http%3A%2F%2Fwww.revistaecuadorianadecienciaanimal.com%2Findex.php%2FRECA%2Farticle%2Fdownload%2F30%2F26%2F&usg=AOvVaw2WBpt>

- Levett, P. (2001). *leptospirosis*. *Clinical Microbiology Reviews*. doi:<https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>
- Linzitto, O., & Orellana, J. (2008). Leptospirosis clínica Humana y Animal. *Enfermedad infecciosas emergentes*, 3(2), 15-19. Obtenido de <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/91968>
- Lujan, E., Pérez, R., & Olmos, M. (Julio de 2019). *Leptospirosis en animales de compañía. Marco jurídico en salud animal y salud pública*. Obtenido de <https://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/2214/LUJAN%2C%20EVELIN%20SOFIA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Luna, A., Moles, C., Gavaldón, R., Nava, V., & Salazar, G. (2008). La leptospirosis canina y su problemática en México. *Salud Anim*, 30(1), 1-11. Obtenido de scielo.sld.cu/pdf/rsa/v30n1/rsa01108.pdf
- Matamala. (2018). Evaluación de la Prueba MAT Y PCR En Sangre y Orina para Determinar el Estatus de Infección de Vacas Lecheras. Obtenido de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2018/fvm971e/doc/fvm971e.pdf>
- Miotto, A., Santana, A., Taniwaki, S., Brandao, P., heinemann, M., & Hagiwaraa, M. (2018). *Desarrollo y validación de un ensayo de PCR en tiempo real basado en TaqMan modificado dirigido al gen lipL32 para la detección de leptospiras patógenas en muestras de orina canina* (Vol. 14). Brasil: Brazilian Journal of Microbiology. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.09.004>
- Montalvo, N., & Palma, B. (2021). *Identificación de leptospira patógena mediante el uso de PCR en bovinos del centro de faenamiento Portoviejo, y su potencial riesgo de infección al ser humano*. Obtenido de <http://repositorio.utm.edu.ec:3000/server/api/core/bitstreams/fa170c9a-07b4-4a5d-8ca7-3528a628cc0f/content>
- Muñoz, C., Mason, M., Encina, C., Astroza, A., & Romero, A. (2014). *Leptospira Contamination in Household and Environmental Water in Rural Communities in Southern Chile*. Chile: Institute of Animal Pathology, Austral University of Chile. doi:<https://doi.org/10.3390/ijerph110706666>

- Murcia , C., Astudillo, M., & Romero, M. (20 de Agosto de 2020). Prevalencia de leptospirosis en perros de trabajo vacunados y en población humana con riesgo ocupacional. *Scielo*, 40. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572020000500062
- Núñez, A., Espinoza, J., Sihuincha, M., & Suarez, L. (Marzo de 2015). Coinfección por dengue y leptospirosis en una niña de la amazonía peruana. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 32(1). Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342015000100025
- Núñez, M., Fortuna, M., Veras, B., Medina, A., Mena, L., Gutiérrez, E., . . . Aybar, A. (2022). *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)* (Vol. 6). Ciencia y Salud. doi:10.22206/CYSA.2022.V6I1.PP17-24
- Ochoa, J. (2018). *PREVALENCIA E IDENTIFICACION DE FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LEPTOSPIROSIS CANINA Y SU IMPACTO EN SALUD PÚBLICA EN EL MUNICIPIO DE VERACRUZ, MEXICO*. Obtenido de <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/1944/50889/OchoaValenciaJose.pdf?sequence=1>
- Ospina, C., Rincón, M., Soler, D., & Hernández, P. (2017). *Papel de los roedores en la transmisión de Leptospira spp. en granjas porcinas* (Vol. 4). Colombia: Rev. Salud Pública. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rsap/v19n4/0124-0064-rsap-19-04-00555.pdf>
- Pedrosa, A. (1999). Reacción en cadena de la polimerasa. *Archivo Médico de Camagüey*, 3(2). Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02551999000200011

- Pesantez, K., & Aguilar, F. (2021). *Estudio retrospectivo de la leptospirosis canina entre el periodo 2010 - 2021 y su situación epidemiológica actual en el Ecuador*. Obtenido de [Tesis de pregrado de la Universidad Técnica de Machala]: <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/17572>
- Putro, D., Ristiyanto, Mulyono, A., Handayani, F., & Joharina, A. (2016). *Deteksi Leptospira Patogenik pada Urin Anjing dengan polymerasa chain reaction PCR di kota Semarang* (Vol. 8). Indonesia: Vektora. Obtenido de <https://media.neliti.com/media/publications/127330-ID-deteksi-leptospira-patogenik-pada-urin-a.pdf>
- Rojas, P., Miller, I., Monahan, A., & Schuller, S. (2010). *DETECTION AND QUANTIFICATION OF LEPTOSPIRES IN URINE OF DOGS: A MAINTENANCE HOST FOR THE ZOONOTIC DISEASE LEPTOSPIROSIS*. Obtenido de file:///C:/Users/bryan/Downloads/PEER_stage2_10.1007252Fs10096-010-0991-2.pdf
- Romero, C. (2014). *Prevalencia de leptospirosis canina en el centro poblado en nuevo Sullana*. Perú: Universidad Nacional de Piuria.
- Romero, M., Sanchez, J., & Hayek, L. (2010). *Prevalencia de ensayos contra Leptospira en población urbana humana y canina del departamento del Tolima*. (Vol. 12). Bogotá: Revista de salud pública. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/274846503_Prevalencia_de_anticuerpos_contra_Leptospira_en_poblacion_urbana_humana_y_canina_del_Departamento_del_Tolima
- Rovid, A., Roth, J., & Galyon, J. (2010). *Enfermedades Emergentes y Exóticas de los Animales*. Ames: Iowa State University. Obtenido de https://books.google.com.ec/books?id=s1R6wsyeT4IC&pg=PA21&dq=vias+de+transmision+puede+ser+horizontal+y+vertical&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwiervq00NL3AhXuK0QIHxm_Bg8Q6AF6BAgJEAI#v=onepage&q=vias%20de%20transmision%20puede%20ser%20horizontal%20y%20vertical&

- Sedano, A. (2014). Estandarización e implimentación de una técnica de PCR para la detención de leptospira spp. patógenas en muestra de orina de caninos domésticos. Obtenido de https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/3842/Sedano_sa.pdf;jsessionid=30BA98A0A7610B12C8CAA3CAE26A4A34?sequence=1
- Sheleby , J. (2007). *seroprevalencia de leptospirosis y tipificación de serovares circulantes en caninos de los municipios d el sauce y Achuapa del departamneto de León*. Nicaragua: Universidad Nacional Autonoma Nicaragua Una-León. Obtenido de <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/1030/1/203069.pdf>
- Silva, R., & Riedemann, S. (2007). *Seroprevalencia de leptospirosis canina en perros atendidos atendidos en clínicas veterinarias mediante Aglutinación microscópica y comparación con las técnicas de aislamiento e inmunofluorescencia indirecta*. Chile: Arch Med Vet. Obtenido de <https://www.scielo.cl/pdf/amv/v39n3/art11.pdf>
- Sosa, A. (Mayo de 2015). *Detección de Leptospira en el cantón Portoviejo (Manabí)*. Quito . Obtenido de <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/4887/1/120361.pdf>
- Stoddard, R. (2013). *Detection of pathogenic Leptospira spp. through real-time PCR (qPCR) targeting the LipL32 gene*. *Methods Mol Biol*, 943, 257-266.: doi:10.1007/978-1-60327-353-4_17.
- Sykes, J., Hartmann, k., Lunn, K., Moore, G., stoddard, R., & Goldstein, R. (2010). *2010 ACVIM small animal concensus statement on leptospirosis: (Vol. 25)*. *J Vet Intern*. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0654.x>
- Thrusfield, M., Christley, R., Brown, H., Diggle, P., French, N., Howe, K., . . . Wood, H. (2018). *Veterinary Epidemiology (Fourth Edition ed.)*.

- Torres , M., Hernández, S., Agudelo, P., Arroyave, E., Zavala, J., & Puerto, F. (2015). Revisión actual de la epidemiología de la Leptospirosis. *Rev med*, 54(5), 620-625. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2016/im165k.pdf>
- Tortora , G., Funke , B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología (9na ed)*. Medica Panamericana. Obtenido de https://books.google.com.ec/books?id=Nxb3iETuwpIC&pg=PA789&dq=introducci%C3%B3n+de+la+leptospiras&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjAjK7a8_HxAhXpTjABHYEiAtEQ6AEwAnoECAoQAg#v=onepage&q=introducci%C3%B3n%20de%20la%20leptospiras&f=false
- Tostes , O., Belle , J., welker , A., Pires , A., Stedile, R., Larruscain, M., . . . Hilario, F. (2012). *Exposure to Leptospira spp. in Sick Dogs, Shelter Dogs and Dogs from an Endemic Area: Points to Consider* (Vol. 40). Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Tuемmers, C., Lüders, C., Rojas , C., Serri, M., Espinoza, R., & Castillo, C. (2013). Prevalencia de leptospirosis en perros vagos capturados en la ciudad de Temuco, 2011. *Chilena de infectología*, 30(3), 252-257. Obtenido de <https://www.readcube.com/articles/10.4067/S0716-10182013000300003>
- Uribe, D. (2016). Leptospirosis en Bull Terrier.reporte de caso. *Veterinaria y zootecnia*, 10(1), 104-114. Obtenido de <http://vetzootec.ucaldas.edu.co/downloads/v10n1a08.pdf>
- Vicari, D., Perciapael, M., Concetta, L., Li-Vecchi, L., Curro, V., Vitale, M., & Vincenzo, F. (2007). Evidence of canine leptospirosis in Kennels in Sicily, by PCR method. *Cuana de Medicina Tropical*, 59(1). Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602007000100012
- Zaidi, S., Bouam, A., Bessas, A., Hezil, D., Ghaoui, H., Ait, K., . . . Bitam, I. (2018). *Urinary shedding of pathoenic Leptospira i stray dogs and cat, algiers: A*

prospective study. Estados Unidos: University of Kentucky college of medicine.
doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197068>

Anexo 2 : Porcentaje de caninos por raza utilizados en el estudio

Raza	Muestras	Porcentaje
Caniche	2	0,67
Mestizo	175	58,70
Pitbull	9	3,02
Golden	6	2,01
Bulldog ingles	3	1,00
Chihuahua	5	1,67
Cocker americano	1	0,33
Dálmata	1	0,33
Dóberman	1	0,33
French poodle	29	9,73
Golden Retriever	3	1,00
Husky siberiano	16	5,36
Labrador	7	2,34
Mastín napolitano	1	0,33
Pastor Alemán	3	1,00
Pekínés	2	0,67
Pincher	3	1,00
Pug	3	1,00
Rottweiler	1	0,33
Salchicha	2	0,67
Schnauzer	22	7,38
Shih Tzu	2	0,67
Yorkshire	1	0,33
Total	298	100,00

Anexo 3: Características por procedencia de los caninos seleccionados para el estudio.

Procedencia	N	Porcentaje	
Portoviejo	Florón	21	7,04
	Picoaza	11	3,69
	Complejo	1	0,33
	Calderón	1	0,33
	Playa Prieta	1	0,33
	San Jorge	2	0,67
	Río Chico	2	0,67
	Higuerón	10	3,35
	18 de octubre	1	0,33
	Guabito	1	0,33
	Centro de Portoviejo	157	52,68
	Estancia vieja	6	2,01
	Vicente Veliz	1	0,33
	Colón	6	2,01
Ambato	Ambato	1	0,33
Bolívar	Calceta	2	0,67
Montecristi	Montecristi	1	0,33
Guayaquil	Guayaquil	3	1,00
Manta	Centro de Manta	20	6,71
	San Juan	13	4,36
	San Lorenzo	22	7,38
Quevedo	Quevedo	1	0,33
Quito	Quito	2	0,67
Rocafuerte	Rocafuerte	1	0,33
Santa Ana		2	0,67
Puerto López	Puerto López	1	0,33
Jaramijó	Jaramijó	1	0,33
Sucre	Bahía	7	2,34
Total		298	100,00

Anexo 4: Recolección de muestra

Extracción de orina canina mediante sondas



Anexo 5: procesamiento y extracción de ADN en el laboratorio de



muestras de orina.



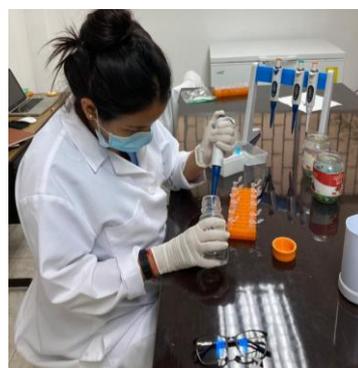
Lavado de muestras de orina con PBS.



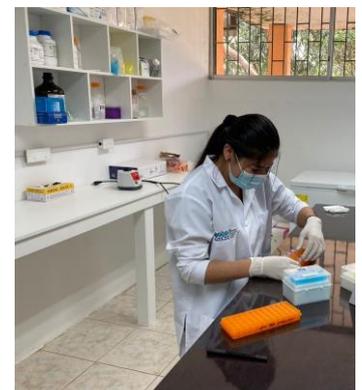
Termociclador con las muestras de canino



Aplicación de buffer de lisis y de proteinasa K



Precipitación de las muestras con etanol.



Agregar agua de PCR

