UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

TRABAJO DE TITULACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TEMA:

PREVALENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA LEPTOSPIRA PATÓGENA Y RIESGO DE INFECCIÓN EN CENTROS DE RESCATE CANINO DE LA PROVINCIA DE MANABÍ

AUTORES:

GONZÁLEZ MEDINA MELINA MONSERRATE

AGUILAR PADILLA HENRY RODRIGO

TUTOR:

DR. MONTES ZAMBRANO VICTOR

LODANA – MANABÍ – ECUADOR

2022

DEDICATORIA

Mi esfuerzo continuo para lograr este objetivo no sería posible sin la guía de Dios, por estar presente en cada paso de mi vida, permitiéndome levantar y continuar en cada tropiezo, siendo mi fortaleza.

Dedicado a mis padres Liliana y Kenny por ser mi guía y apoyarme en esta etapa de formación, por sus constantes esfuerzos alentándome a seguir preparándome y cumplir mis metas, a mis hermanas Génesis y Edith, que con su ejemplo me animan a seguir adelante, a mi difunta abuela Elvia por su incondicional apoyo y afecto, me motivó a cumplir mis sueños, a mis familiares que siempre han creído en mí, reconociendo mi potencial y me animan a ser una mejor persona.

A todas las personas, amigos, compañeros, que en esta etapa me acompañaron, animaron, y fueron parte de mi formación y aprendizaje, a mi tutor de tesis el Dr. Víctor Montes, por impartirnos sus conocimientos, ser una guía y ejemplo.

MELINA MONSERRATE GONZÁLEZ MEDINA

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación se lo dedico a Dios, por acompañarme y cuidarme en todo momento, llenarme de fuerza cada día para poder culminar una meta más en mi vida.

A mi madre y mi padre que son el motor principal de vida, por todo el sacrificio, amor y comprensión que me han demostrado a lo largo de este proceso, por el esfuerzo que han realizado por años, para que uno de mis sueños se hiciera realidad.

Para mis amigos que siempre estuvieron en las buenas y en las malas, motivándome a seguir adelante a pesar de cada tropiezo en el camino y de esta forma ayudarme a que este proyecto sea posible.

A mi segunda familia que desde el cielo siempre me están cuidando, siendo mis ángeles protectores los cuales me guían en mi día a día.

En fin, este proyecto va dedicado a todas las personas que creyeron en mí, mi familia, amigos, docentes, a mi tutor y compañeros de profesión. Hoy podemos decir que todas las malas noches, llantos y madrugadas traen su recompensa.

HENRY RODRIGO AGUILAR PADILLA

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestros padres por su constancia y dedicación, por brindarnos la oportunidad de obtener estudios profesionales, a nuestras familias por ser parte de nuestro crecimiento y apoyo constante en esta etapa. A nuestros amigos y compañeros cercanos que con su ayuda y compañía fueron parte de este camino.

Agradecidos con la Universidad Técnica de Manabí, nuestra Facultad de Ciencias Veterinarias, y docentes presentes en esta etapa universitaria que aportaron conocimientos fundamentales en nuestra carrera profesional.

Al Dr. Víctor Montes por ser nuestro tutor de tesis aportándonos conocimientos forjando nuestro aprendizaje y formación profesional, de igual forma al Grupo Epidemiológico de Enfermedades Zoonóticas del Ecuador (GEEZE), por ser un aporte importante a nuestra investigación, a cada miembro por haber contribuido y compartido sus conocimientos a nosotros como posteriores tesistas.

A los propietarios y personal de centros de rescate por su ayuda y colaboración en parte de la investigación y a nuestros compañeros presentes en el proceso de recolección de muestras.

MELINA GONZÁLEZ Y HENRY AGUILAR

CERTIFICACIÓN

Dr. Víctor Montes Zambrano, Certifica que el trabajo de Titulación en la Modalidad Proyecto de Investigación titulada: "PREVALENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA LEPTOSPIRA PATÓGENA Y RIESGO DE INFECCIÓN EN CENTROS DE RESCATE CANINO DE LA PROVINCIA DE MANABÍ". Es trabajo original de los Señores estudiante: Aguilar Padilla Henry R y González Medina Melina M, el que ha sido realizado bajo mi supervisión.

Santa Ana, 31 de Enero del 2022

Dr. Víctor Montes Zambrano
TUTOR DE TITULACIÓN

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

TRABAJO DE TITULACIÓN

TEMA:

"PREVALENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA LEPTOSPIRA PATÓGENA Y RIESGO DE INFECCIÓN EN CENTROS DE RESCATE CANINO DE LA PROVINCIA DE MANABÍ"

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

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADO POR EL TRIBUNAL DE DEFENSA

Dr. Edis Macías Rodríguez Ph.D
DECANO-PRESIDENTE

Dr. Víctor Montes Zambrano Ph.D
TUTOR DE TITULACIÓN

Dr. Sixto Reyna Gallegos Ph.D
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dra. Marina Zambrano Aguayo. Ph.D
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Daniel Burgos Macías. Mg Sc
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Melina Monserrate González Medina y Henry Rodrigo Aguilar Padilla, declaramos que la investigación titulada "PREVALENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA LEPTOSPIRA PATÓGENA Y RIESGO DE INFECCIÓN EN CENTROS DE RESCATE CANINO DE LA PROVINCIA DE MANABÍ "es un trabajo original de nuestra autoría.

Los autores concedemos a la Universidad Técnica de Manabí, permiso para reproducir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de los autores.

Melina González Medina

Henry Aguilar Padilla

ÍNDICE

RESUMEN V
SUMMARY VI
I. INTRODUCCIÓN 6
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 9
III. ANTECEDENTES 10
V. OBJETIVOS 13
5.1. Objetivo General 13
5.2. Objetivos Específicos 13
VI. MARCO REFERENCIAL 14
6.1. Generalidades de Leptospira 14
6.2. Etiología 15
6.3. Taxonomía y clasificación 15
6.4. Epidemiologia 16
6.4.1. Reservorio 17
6.5. Transmisión 17
6.5.1. Factores de riesgo 18
6.6. Leptospirosis canina 18
6.6.1. Patogenia 19
6.6.2. Respuesta inmune 20
6.6.3. Inmunidad vacunal 20
6.6.4. Signos clínicos 21
6.7. Pruebas diagnósticas 22
6.7.1. Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT) 22
6.7.2. Microscopía de campo oscuro (DFM) 23
6.8. Control y prevención 24
7.1. Modalidad y Tipo de Investigación 26
7.2. Población y muestra 26
7.3. Tipo de muestreo 26
7.4. Toma de muestra y procesamiento 27
7.5. Técnicas diagnósticas 27
7.5.1. Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT) 27
7.5.2. Microscopía de Campo Oscuro (DFM) 29
VIII. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN 30

8.1. Muestras sanguíneas de caninos extraídas en centros de rescate de Manabí.... 30
8.2. Prevalencia de Leptospira patógena en centros de rescate canino de Manabí.. 31
8.2.1. Distribución de casos positivos a Leptospira patógena según MAT en los diferentes centros de rescate..... 31
8.2.2. Distribución de casos positivos a Leptospira patógena según MAT de acuerdo con el sexo. 32
8.2.3. Distribución de casos positivos a Leptospira patógena según MAT de acuerdo al antecedente de vacunación. 33
8.3. Frecuencia de serovares de Leptospira patógena en centros de rescate canino de la provincia de Manabí..... 34
8.4. Títulos más altos reaccionantes a serovares patógenos según Técnica de Aglutinación Microscópica..... 36
8.5. Serovares de Leptospira patógena que co-aglutinaron con mayor frecuencia.. 36
8.6. Muestras de orina extraídas en caninos de centros de rescate de Manabí. 38
8.7. Eliminación urinaria de estructuras compatibles con Leptospira según la técnica de Microscopía de Campo Oscuro..... 38
8.7.1. Distribución de casos positivos a DFM en los diferentes centros de rescate…..... 39
8.7.2. Distribución de casos positivos a DFM según el antecedente de vacunación..... 39
IX. DISCUSIÓN..... 40
X. CONCLUSIONES 43
XI. RECOMENDACIONES 44
XII. PRESUPUESTO 45
XIII. CRONOGRAMA VALORADO 46
XIV. BIBLIOGRAFÍA 47
ANEXOS 58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Población de caninos de centros de rescate de los cantones Portoviejo, Manta y Sucre. 26
Tabla 2. Muestras de sangre y orina de caninos obtenidas en los centros de rescate. 27
Tabla 3. Serovares de Leptospira disponibles en el laboratorio de Leptospira de la UTM. 28
Tabla 4. Distribución por sexo de las muestras sanguíneas obtenidas en los centros de rescate estudiados en la provincia de Manabí 30
Tabla 5. Distribución de muestras sanguíneas según inmunidad en los centros de rescate estudiados en la provincia de Manabí..... 30
Tabla 6. Distribución de casos reaccionantes a Leptospira patógena según la Técnica de Aglutinación Microscópica..... 31
Tabla 7. Positividad a Leptospira en los distintos centros de rescate según MAT..... 31
Tabla 8. Positividad a la Técnica de Aglutinación Microscópica según el sexo. 32
Tabla 9. Positividad a la Técnica de Aglutinación Microscópica según el sexo en los diferentes centros de rescate 32
Tabla 10. Positividad a la Técnica de Aglutinación Microscópica según el antecedente de vacunación. 33
Tabla 11. Distribución de casos positivos a MAT por centro de rescate según el antecedente de vacunación. 33
Tabla 12. Frecuencia de serovares de Leptospira patógena según MAT. 34
Tabla 13. Distribución de serovares observados en cada centro de rescate canino..... 35
Tabla 14. Títulos de anticuerpos contra serovares de Leptospira patógena según MAT. 36
Tabla 15. Serovares co-aglutinantes y sus títulos de anticuerpos por MAT. 37
Tabla 16. Distribución de muestras de orina en los centros de rescate 38
Tabla 17. Positividad mediante el uso de la Microscopía de Campo Oscuro en muestras de orina. 38
Tabla 18. Positividad a DFM en muestras orina en los diferentes centros de rescate. 39
Tabla 19. Positividad mediante el uso de la Microscopía de Campo Oscuro según el antecedente de vacunación. 39

RESUMEN

Leptospira es la bacteria causante de la enfermedad llamada Leptospirosis, es de distribución mundial de carácter zoonótico, observándose con frecuencia en climas tropicales o subtropicales, afectando animales domésticos y silvestres, siendo el roedor un reservorio natural y las especies domésticas juegan un papel importante como reservorios de mantenimiento, su transmisión se da de forma directa a través de la orina, sangre, tejidos infectados o por exposición a ambientes contaminados. En el siguiente estudio se evaluó la prevalencia de Leptospira patógena y riesgo de infección en cinco centros de rescate canino de la provincia de Manabí, se evaluaron 300 muestras de sangre mediante la Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT) usando un panel diagnóstico de 9 serovares, Sejroe, Canicola, Tarassovi, Hardjo, Bataviae, Wolffii, Pomona, Australis y Castellonis, considerando un punto de corte al MAT de 1:100 para declarar la muestra como positiva, obteniendo una prevalencia del 27,0%, IC95% 22,3–32,4, una mayor probabilidad de exposición en machos 38,0% que en hembras 22,6%; la probabilidad de exposición no fue diferente en perros con o sin antecedentes de vacunación; siendo los serovares más frecuente Canicola con el 11,0%, Castellonis 8,7%, Australis 7,7%, Sejroe 7,0%, Tarassovi 5,7%, Wolffii 5,3% y Bataviae 5,0% ; el titulo más alto al MAT fue de 1:400; una prevalencia de infección en machos al microscopio de campo oscuro de 45,8% IC95% 31,7–59,9 fue observado; se concluye que hay una prevalencia moderada a exposición y una alta prevalencia de infectar con Leptospira patógena, en los centros de rescate, lo que conlleva a generar una alerta de riesgo de transmisión entre animales de estos centros, así como las posibles personas que adoptan una mascota.

.

SUMMARY

Leptospira is the bacterium that causes the disease called leptospirosis, it has a worldwide distribution of a zoonotic nature, frequently observed in tropical or subtropical climates, affecting domestic and wild animals, the rodent being a natural reservoir and domestic species play an important role as maintenance reservoirs, its transmission occurs directly through urine, blood infected tissues or by exposure to contaminated environments. In the following study, the prevalence of pathogenic Leptospira and the risk of infection were evaluated in five canine rescue centers in the province of Manabí, 300 blood samples were evaluated using the Microscopic Agglutination Technique (MAT) using a diagnostic panel of 9 serovars, Sejroe, Canicola, Tarassovi, Hardjo, Bataviae, Wolffii, Pomona, Australis and Castellonis, considering a cut-off point to the MAT of 1:100 to declare the sample as positive, obtaining a prevalence of 27,0%, 95%CI 22,3-32,4, a greater probability of infection in males 38,0% than in females 22,6% the probability of exposure was not higher or lower in dogs with or without a vaccination history; being the most frequent serovar Canicola with 11,0% followed by Castellonis 8,7%, Australis 7,7%, Sejroe 7,0%, Tarassovi 5,7%, Wolffii 5,3% y Bataviae 5,0%; reaching the highest titer of 1:400; a prevalence of infection in male by Dark Field Microscopy of 45,8% CI95% 32.7-59.9 were reported; It is concluded that there is a moderate prevalence of exposure and high prevalence of infection with pathogenic Leptospira in dogs from rescue centers, with leads to generating an alert of the risk of transmission between animals in these centers, as well as possible people who adopt a pet.

I. INTRODUCCIÓN

La bacteria Leptospira es causante de la enfermedad infecciosa llamada Leptospirosis, es zoonótica de distribución mundial, observada mayormente en áreas subtropicales y tropicales que poseen precipitaciones pluviales elevadas; es considerada una amenaza para la salud pública (Galarde, 2017). En países de América Latina que cumplen con estas condiciones se reportan la mayor cantidad de casos en humanos, según la Organización Panamericana de la Salud (OPS) estos países son Brasil, Perú, Colombia y Ecuador; tomando en consideración la característica zoonótica de la enfermedad, el papel de los animales en la epidemiología de esta es un factor importante a considerar en estos territorios (Schneider *et al*., 2017).

En Ecuador, precisamente en Manabí, se han realizado estudios que muestran la presencia de Leptospira en animales y humanos, ya que esta provincia cumple con las condiciones adecuadas para el desarrollo de la bacteria, además de la presencia de especies como bovinos, porcinos y caninos que participan en la diseminación de esta (Zambrano *et al*., 2017).

Es conocido además que Leptospira afecta a más de 160 especies de animales domésticos y silvestres, que actúan como reservorios o padecen la infección con distinta gravedad, causando brotes o presentándose de forma endémica en muchos países, teniendo un rol considerable en la epidemiología de la enfermedad la especie canina junto con los roedores, que son los principales reservorios en zonas urbanas y mantienen Leptospira en el ambiente (Martín, 2018).

Los roedores como reservorios mantienen una relación comensal con las espiroquetas, ya que pueden transmitirlas a sus crías en el útero o en periodo neonatal, no desarrollan síntomas, alojan diferentes serovares patógenos, contribuyen a que estos circulen en áreas determinadas sin implicar a hospederos accidentales, además son considerados principales diseminadores por su capacidad de eliminar Leptospira en la orina favorecido por su pH alcalino (Torres *et al*., 2016).

Por otra parte, al ser los perros reservorios y fuente de contagio pueden ser transmisores de Leptospira a otras especies incluso al humano (Alonso, 2020), pueden ser infectados por el contacto con la orina de roedores, dándose casos con mayor ocurrencia en estación de lluvia por el estancamiento de agua; los casos en perros se ven favorecidos

en perreras, más aún cuando estas tienen condiciones sanitarias deficientes (Chuva & Yunga, 2019).

En esta especie se evidencian signos de enfermedad, la forma de presentación puede ser a través de lesiones severas en riñones e hígado, con cuatro formas de manifestarse, ya sea de manera ictérica, hemorrágica, urémica y reproductiva; o pueden ser portadores asintomáticos eliminando Leptospira en la orina (Siuce *et al*., 2015).

En los caninos el serovar más común es Canicola, ya que son reservorios naturales del mismo; los perros pueden transmitir Leptospira luego de una infección subclínica o clínica, en la última etapa de la enfermedad aguda y la fase crónica, ya que es aquí cuando pueden excretar la bacteria a través de la orina y se convierten en portadores; etapa que puede durar hasta 4 años o más, en la cual transmiten la enfermedad a otros animales y al hombre (Luna *et al*., 2008).

La identificación de anticuerpos específicos mediante la prueba diagnóstica estándar, proporcionada por MAT, es una estimación del título de anticuerpos contra Leptospira presente en suero, lo que confirma la exposición del animal a la bacteria cuando se presentan títulos positivos (Azocar *et al*., 2014). Sin embargo, no hay un título de diagnóstico definitivo, por lo cual se debe relacionar los resultados con los signos clínicos y el incremento de títulos en muestreos pareados, se presume infección en perros con antecedentes de vacunación con títulos de anticuerpos persistentes de 1:1600 o más, pero con títulos de 1:800 o más no es posible un diagnóstico certero (Murcia *et al*., 2020).

Como método de diagnóstico directo, se hace uso de la observación microscópica para detectar Leptospira en fluidos corporales, siendo la microscopía de campo oscuro el método habitual, por medio de este se observan Leptospiras como varillas delgadas, brillantes y activamente móviles, su motilidad es característica con giros y sacudidas rápidas (Budihal & Perwez, 2014). Esta es una técnica exigente, ya que reconocer Leptospiras, es difícil, más cuando estas son pequeñas, esta técnica debe considerarse una ayuda que puede sugerir, pero no establecer un diagnóstico de infección, ya que artefactos en la muestra pueden producir diagnósticos falsos positivos (Mythri, 2015).

Según Ahmad *et al.* (2005), la microscopía de campo oscuro y la serología son consideradas la base del diagnóstico en la mayoría de los casos sin embargo se debe considerar la eficacia de estas para un correcto rendimiento; la microscopía de campo oscuro (DFM) es conveniente para visualizar Leptospira en sangre, orina y rara vez en líquido cefalorraquídeo, sin embargo, este método diagnóstico carece de sensibilidad y especificidad, ya que son necesarias 10^4 leptospira/ml para que un organismo por campo sea visible; debido a esto no se la puede usar como única herramienta de diagnóstico, de forma que se hace uso de pruebas serológicas, siendo la prueba de Aglutinación Microscópica MAT muy usada para estudios epidemiológicos en Leptospira.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los caninos junto con los roedores son considerados reservorios y transmisores importantes en la epidemiología de la Leptospirosis (Martín, 2018), representan un riesgo en la salud humana y animal; poblaciones considerables de perros se hayan en centros de rescate existiendo la posibilidad de exposición a Leptospira en ellos.

Al ingresar al centro de rescate los perros presentan un estatus desconocido, con procedencia de calle en su mayoría, teniendo posiblemente un mayor grado de exposición la bacteria (Miotto *et al*., 2018) por su alimentación con sobras o resto de alimentos encontrados en basureros, pudiendo tener contactos con roedores, convivir con otras especies animales o incluso contacto con aguas estancadas mientras deambulaban sin hogar.

Frente a la exposición existe la posibilidad de contagio y diseminación de Leptospira, de manera que representa un riesgo para el personal, el resto de animales en las instalaciones y posibles adoptantes (Moraes *et al*., 2020).

III. ANTECEDENTES

Según Spangler *et al.* (2020) tanto perros y gatos de refugios son portadores de varias enfermedades zoonóticas, por condiciones como alta densidad poblacional, mala condición de vida, estrés y exposición a roedores, siendo Leptospira una de las enfermedades zoonóticas reportadas en la especie canina.

Se ha identificado mayor prevalencia en países con climas cálidos que en regiones templadas, debido a la supervivencia de la bacteria en condiciones cálidas y húmedas; en determinadas áreas se considera la Leptospirosis un problema relevante, como en las islas del Pacífico, que son consideradas áreas de alto riesgo, en Nueva Caledonia, se ha demostrado una prevalencia a Leptospira del 43% en perros de perreras (Roqueplo *et al*., 2013).

Otro estudio realizado en la Isla Cerdeña de Italia que incluyó perros de centros de rescates y con propietarios registró una prevalencia del 89% y 11% respectivamente, las muestras positivas incluyeron perros vacunados y no vacunados, mostrando positividad para los serovares Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Bratislava, Grippothyphosa y Canicola (Piredda *et al*., 2021).

Tailandia un país que a pesar de cumplir con las condiciones climáticas para el desarrollo de Leptospira, ha reportado en un estudio una prevalencia baja del 12,1% en perros callejeros y con propietarios que no se han vacunado, detectando que los serogrupos más comunes fueron Sejroe (4,4%), Icterohaemorrhagiae (3,7%), Bataviae (2,9%) y Canicola (2,6%) (Altheimer *et al*., 2020).

En países de Latinoamérica, estudios realizados en perros de albergues, de calle o de propiedad en zonas rurales y urbanas, registran en su mayoría prevalencias altas de exposición a Leptospira, lo que se relaciona aparentemente con el contacto de perros con otras especies animales, roedores, agua estancada, zanjas, la permanencia de estos al aire libre, en el caso de perros de albergues por el hacinamiento, medidas de higiene deficientes, falta de cuarentenas y control serológico de los animales que ingresan.

Un estudio realizado en Colombia en perros con propietarios de zonas indígenas muestra una prevalencia de 79,9% (Romero *et al*., 2018); mientras en Venezuela la prevalencia en un albergue del estado de Aragua para perros callejeros fue del 100%,

mostrando positividad para más de un serovar, siendo los más frecuentes, Icterohaemorrhagiae, Canicola y Hardjo (Medina *et al*., 2010).

En Argentina en áreas periurbanas de la provincia de Buenos Aires se ha demostrado un alto riesgo de infección para los caninos, con una tasa del 75%, además se ha registrado tasas de infección entre el 11,5% y el 80,4% en refugios (Scialfa, 2021). En Ciudad de Córdoba se reportó una prevalencia del 82,35% en perros de compañía, presentándose con mayor frecuencia los serovares Hardjo 89,28%, Castellonis 44,05% y Canicola 35,71% (Rollán *et al*., 2018).

En Brasil un estudio en centros de recate canino, demostró que los perros pueden actuar como hospederos de distintas Leptospira patógena, estar infectados, no presentar síntomas y ser adoptados sin ser diagnosticados, pasando de manera inadvertida a manos de sus nuevos dueños, lo que aumenta el riesgo de transmisión de esta enfermedad zoonótica. Además, se identificó infección crónica y cepas patógenas, reportando mayormente los serogrupos Sejroe y Canicola; se observó leptospiruria en un 10,6% (13/123) de la población canina mediante múltiples métodos de diagnóstico que incluyeron PCR, MAT, examen físico, bioquímico y sérico (Miotto *et al*., 2018).

Estudios en Ecuador en la zona norte de la sierra muestran una prevalencia de 8,1% en perros callejeros que circulan alrededor de camales donde se faenan bovinos, presentándose con mayor frecuencia de los serovares Pomona en un 35%, Canicola 26%, Sejroe 32%, Tarassovi 6% e Icterohaemorrhagiae 4% (Lazcano *et al.*, 2017). Mientras en Azuay en la parroquia Tarqui, en perros de domicilios y haciendas se registró una positividad alta del 61,8% (154/249), encontrando con mayor frecuencia los serovares Canicola 26%, Grippotyphosa (22%), Bataviae 18% y Sejroe 17% (Chuva & Yunga, 2019).

En Manabí se han registrado prevalencias en caninos domésticos, en la parroquia Calderón del 39%, reaccionando mayormente a los serovares Canicola 28%, Sejroe 8,7%, Grippotyphosa 3,2%, Icterohaemorrhagiae 2,8% (Carreño & Cedeño, 2014); un estudio reciente realizado en caninos de la ciudad de Portoviejo estableció una prevalencia del 12,6% siendo los serovares más frecuentes, Canicola con 6,3%; Hardjo 5,0% y Tarassovi 2,6% (Velásquez & Garzón, 2020). Sin embargo, en la provincia no se registran estudios de Leptospira en caninos de centros de rescate lo que hace interesante conocer la prevalencia de la enfermedad en esta población de estudio.

IV. JUSTIFICACIÓN

En Ecuador la Leptospirosis consta dentro de las zoonosis de vigilancia epidemiológica, según el Ministerio de Salud Pública (MSP) entre los años 2019 y 2020 se reportaron 212 casos; en el año 2021 de la semana 1 a la 51 se han notificado 68 casos, teniendo la provincia de Manabí 17 casos, seguida de Zamora Chinchipe con 11 casos y Sucumbíos con 10 casos (MSP, 2021). Es en Manabí donde predominan los casos de Leptospirosis, lo que evidencia la circulación de la bacteria, y al ser los animales quienes cumplen un rol importante en el mantenimiento y transmisión de serovares patógenos, es necesario identificar la presencia de Leptospira en ellos.

Esta investigación pretende dar a conocer la prevalencia de Leptospira en la especie canina, ya que cumple un papel importante en la epidemiología de la enfermedad, sin embargo, son pocos los reportes de prevalencia en esta especie en la provincia de Manabí, en Portoviejo se han reportado prevalencias por Carreño y Cedeño (2014) del 39% y por Velásquez y Garzón (2020) del 12,6% en perros con propietarios, lo que hace pertinente realizar este estudio, escogiendo como población objetivo los perros de centros de rescate.

Ya que se ha demostrado el rol de los perros de refugios y de procedencia de calle, como reservorios de Leptospira patógena y posibles transmisores de la enfermedad, haciendo uso de MAT se ha reportado prevalencias del 12,1% en Tailandia (Altheimer *et al*., 2020); del 13% en Estados Unidos (Spangler *et al.*,2020); 43% en Brasil (Miotto *et al*., 2018); 8,6% México (Cruz *et al*., 2013) y el 100% en Venezuela (Medina *et al.*, 2010). Mediante microscopía de campo oscuro en orina, se ha reportado en la India un 40% (Bojiraj *et al.*, 2018); y 50% de muestras positivas (Krishna *et al.*, 2012).

Estos perros pueden estar más expuestos a Leptospira, ya que en su mayoría han tenido vida callejera o vivieron en malas condiciones, ingresan a las instalaciones sin conocerse su estado sanitario, pudiendo portar y diseminar la bacteria. Por lo cual este trabajo de investigación da a conocer de manera más detallada la exposición de Leptospira en caninos de centros de rescate de las ciudades Manta, Portoviejo y Bahía de Caráquez, evaluando la presencia de anticuerpos en sangre mediante prueba MAT y capacidad infecciosa mediante microscopía de campo oscuro en orina.

V. OBJETIVOS

5.1.Objetivo General

Evaluar la prevalencia de Leptospira patógena y capacidad infecciosa en centros de rescate canino ubicados en la provincia de Manabí.

5.2.Objetivos Específicos

- Determinar la prevalencia de exposición a Leptospira patógena en los diferentes centros de rescate canino de la provincia de Manabí a través de la Técnica de Aglutinación Microscópica.
- Establecer los serovares más frecuentes observados en los diferentes centros de rescate canino de la provincia de Manabí.
- Establecer la capacidad infecciosa presente en los centros de rescate canino de la provincia de Manabí a través de la técnica de microscopio de campo oscuro.

VI. MARCO REFERENCIAL

6.1.Generalidades de Leptospira

Louis Landouzy registró por primera vez Leptospira humana en 1883 como una entidad clínica diferente a las ya conocidas y en 1886 Adolf Weil observó signos de la enfermedad en trabajadores agrícolas, como fiebre, ictericia, hemorragia, insuficiencia hepática y renal, llamándola en 1888 enfermedad de Weil (Bautista *et al.,* 2019). Inada e Ido en Japón durante la segunda década del siglo XX reconocieron Leptospiras, realizando el primer aislamiento al inyectar cobayas intraperitonealmente con sangre de pacientes con la enfermedad, produciendo Leptospirosis aguda típica en los animales (Levett, 2001). Eodsworth en 1922 informó el primer caso en seres humanos documentado adecuadamente y aislando el agente, con investigaciones realizadas a partir de ese momento se han identificado nuevos serotipos de Leptospiras patógenas para animales y el hombre (Acosta *et al*., 1994).

La bacteria Leptospira se presenta frecuentemente en climas tropicales o subtropicales, afectando a mamíferos domésticos, silvestres y al humano (Torres *et al*., 2016). Especies silvestres de roedores son reservorios naturales de Leptospira y desempeñan un papel importante en la epidemiología de la enfermedad, manteniendo la infección endémica en áreas determinadas, los mamíferos domésticos como bovinos, porcinos, equinos, y caninos actúan como hospederos, en los cuales se reconocen diferentes serovares y algunos específicos en ciertas especies (Bautista *et al*., 2019). Se mantiene de forma indefinida en un animal infectado que actúa como reservorio de la bacteria, también de igual forma se mantiene en algunos mamíferos que presentan alguna variedad de Leptospira patógena (García de la Peña, 2014).

Su transmisión se da por contacto directo con la orina, sangre, tejidos infectados, exposición a un entorno contaminado, Leptospira puede sobrevivir durante muchos meses en el agua siendo un vehículo importante para la transmisión (Campos, 2014). En los perros la sintomatología es variable, presentándose con ictericia, hemorragias o la ausencia de signos clínicos, en la forma aguda de la enfermedad se observa dolor muscular, hemorragia en la boca, faringitis, gastroenteritis y nefritis aguda, en la forma subaguda o crónica se presenta con vómito, postración, anemia y falta de apetito (García de la Peña, 2014).

6.2.Etiología

La bacteria Leptospira es una espiroqueta, pertenece al género *Leptospira*, el cual proviene del griego *leptos* (delgado) y del latín *spira* (espiral), son bacterias móviles parecidas a sacacorchos, con forma de interrogación, tienen una longitud de 6-20 µm y un diámetro de 0,1 µm, aerobias obligadas, crecen en temperaturas entre 28-30°C (Romero & Falconar, 2016), pueden sobrevivir en ambientes húmedos con un pH neutro o ligeramente alcalino de 6,2 a 8,0, por lo cual se disemina con facilidad en la orina de roedores; su periodo de incubación comprende 8 a 10 días (Alonso, 2020).

Al cultivarse necesitan medios con un pH de 7,2 a 7,4 con suero de conejo o albumina bovina, estos son enriquecidos con vitaminas B12, B2, ácidos grasos de cadena larga y sales de amonio, débilmente se tiñen con colorantes de anilina (Pacheco, 2015)

Su multiplicación no se produce fuera del huésped y sobrevive en dependencia de las condiciones del suelo y agua, en suelos húmedos hasta 180 días, varios meses en superficies acuosas, sobreviviendo más en aguas estancadas, tienen sensibilidad al jabón, detergentes, sales biliares, medios ácidos, a la desecación, congelación y calor a 50°C por 10 min (Cano, 2012).

6.3.Taxonomía y clasificación

De acuerdo con Torres *et al.*, (2016) las especies de *Leptospira* pertenecen a:

- División: Procariotes
- Clase: Schizomicetes
- Orden Spirochaetales
- Familia Leptospiraceae
- Género *Leptospira*

El género *Leptospira* se dividieron en dos especies en 1962 según la Subcomisión de Taxonomía de Leptospiras de la Organización Mundial de la Salud, *Leptospira interrogans* (más de 250 serovares, patógeno) y *Leptospira biflexa* (60 serovares, no patógeno), basándose en el comportamiento bioquímico, capacidad de infectar, resistencia a la acción de iones de cobre bivalentes, sus características biológicas y exigencias de cultivo (Laguna, 2000).

Actualmente basándose en estudios de ADN, la clasificación fenotípica está siendo reemplazada por la clasificación genética, sin relación alguna o correspondencia entre ambas clasificaciones, existiendo de esta manera especies genómicas o genomoespecies con serovares patógenos y no patógenos, habiendo serovares que pertenecen a más de una especie genómica (Gutiérrez & Pezo, 2014).

De acuerdo a la Reunión del Subcomité de Taxonomía de Leptospira en noviembre del 2007, la clasificación genotípica comprendía 23 especies, divididas en tres grupos, el grupo infeccioso con 10 especies patógenas: *L. interrogans, L. kirschneri, L. borgpetersenii, L. santarosai, L. noguchii, L. weilii, L. alexanderi, L. kmetyi, L. alstoni y L. mayottensis*; y el grupo de patogenicidad intermedia con 6 especies: *L. inadai, L. broomii, L. fainei, L. wolffii, L. licerasiae y L. venezuelensis*; y el grupo no infeccioso, de bacterias saprofitas con 7 especies: *L. biflexa, L. wolbachii, L. meyeri, L. vanthielii, L. terpstrae, L. yanagawae y L. idonii* (Soncini *et al*., 2021).

Actualmente según el informe de la Reunión del Subcomité de Taxonomía de Leptospira en julio del 2019, se reconocieron 40 nuevas especies (Levett & Picardeau, 2021); identificados dentro de los grupos y subgrupos descritos por Vincent *et al.* (2019) que consiste en dos grupos principales P y S, constando en los grupos las especies Saprofitas aisladas de medios naturales que no causan infección, y las especies Patógenas responsables de la infección en humanos y animales, más las especies ambientales que su estado de virulencia no se ha demostrado, cada grupo se divide en dos subgrupos, el subgrupo P1 de las especies patógenas, P2 de las especies intermedias, S1 de las especies saprofitas y S2 un nuevo subgrupo aun no descrito.

Según Pinta (2020) la clasificación que sirve de utilidad para el diagnóstico de Leptospira, es la clasificación serológica con más de 250 serovares patógenos, los serovares son distinguidos de acuerdo con las diferencias que hay entre las cadenas de los carbohidratos presentes en los lipopolisacáridos de la membrana externa.

6.4.Epidemiologia

Leptospirosis es una zoonosis mundial, distribuida en áreas urbanas y rurales, en climas templados y tropicales, con diferentes condiciones climáticas incrementando su distribución las lluvias intensas, en América Latina la zoonosis tiene un carácter

endémico en la mayoría de los países (Pacheco, 2015). Se estima que la incidencia de Leptospirosis varía de 0,1 a 1/100.000 habitantes/al año en áreas templadas, hasta más de 100/100.000 habitantes/ al año durante epidemias en el trópico, produciéndose cada año entre 300 000 a 500 000 casos graves, con letalidad del 50% (Roqueplo *et al*., 2013).

Se presentan con mayor frecuencia casos en ambientes ocupacionales y rurales, sin embargo, también se ha dado un incremento del reporte de brotes en zonas urbanas y poblaciones con diferente nivel de riesgo, siendo una de las enfermedades más reemergentes. Se consideran principales reservorios los animales silvestres, roedores y animales domésticos, particularmente los bovinos, porcinos y caninos, que pueden ser hospedadores accidentales o de mantenimiento (Romero *et al*., 2010).

Según Cilios *et al*. (2020), la modificación constante de los ecosistemas y hábitats de vida silvestre, y el desplazamiento de estas especies a áreas urbanas o periurbanas, incrementan la posibilidad de contacto directo o indirecto de animales domésticos y silvestres, y la posible transmisión de Leptospira, por lo que esta constante modificación en animales también ocasiona problemas en la salud humana.

6.4.1. Reservorio

Son aquellos animales que sirven como huéspedes y no sufren la enfermedad, transmiten Leptospira a sus crías en el útero o periodo neonatal, favoreciendo así la cadena de transmisión; un portador mantiene Leptospiras viables con capacidad de multiplicarse en sus riñones y excretarlas por la orina (Yunga, 2018).

Un mamífero con estado crónico de infección actúa como reservorio de la enfermedad, una vez infectado el animal puede excretar Leptospira en la orina por el resto de su vida; entre los reservorios más importantes que diseminan la enfermedad están los roedores (Sosa, 2015).

6.5.Transmisión

Su transmisión es de forma directa por el contacto con orina, transferencia venérea, placentaria e ingestión de tejidos infectados, la transmisión de forma indirecta es a

través del suelo, agua y alimentos contaminados con orina de animales infectados (Lujan, 2019).

Puede favorecer la diseminación de la infección la sobrepoblación de animales vagabundos o en criaderos, además de factores ambientales óptimos que favorezcan su supervivencia como aguas cálidas estancadas, suelos con pH neutro o ligeramente alcalino, temperaturas de 25 ºC; se observa infección en perros de zonas rurales o suburbanas expuestos a aguas retenidas, lagos o arroyos (Busson 2018).

6.5.1. Factores de riesgo

Existen factores medioambientales que influyen en su transmisión como la temperatura, humedad, precipitación pluvial, la población circulante de reservorios, hospederos y diversidad de serovares (Torres *et al.*, 2016). Un ambiente húmedo permite la subsistencia de Leptospira, fuentes de agua como estanques, arroyos, canales, desagües, barro, son un factor que favorecen la transmisión de Leptospira en la naturaleza (Romero *et al*., 2016).

Se pueden considerar factores de riesgo del animal el sexo, la edad, exposición a aguas residuales, perros callejeros, animales silvestres, roedores y estado de inmunización (Chuva & Yunga, 2019).

6.6.Leptospirosis canina

Los perros son huéspedes reservorios del serovar Canicola, pudiendo eliminar otras especies o serovares de Leptospira sin presencia de signos clínicos (Piredda *et al*., 2021). Antes de la introducción de vacunas comerciales los serovares más comunes eran Icterohaemorrhagiae y Canicola, desde la introducción de inmunógenos para estos dos serovares, se sospecha la participación de otros como Grippotyphosa, Pomona, Bratislava y Autumnalis, también debido al contacto de perros con reservorios naturales de otros serotipos (Troyano *et al*., 2017).

Los perros se infectan por contacto directo con orina contaminada, por beber o nadar en agua contaminada, consumir alimentos expuestos o infectados por roedores o animales

silvestres portadores (Piredda *et al*., 2021); Hábitos como el olfateo, lengüeteo y cortejo favorecen la transmisión (Monroy *et al*., 2020).

Los animales infectados aun sin presentar signos de enfermedad, a partir de la primera semana post-infección dispersan Leptospira en la orina, ocasionando contaminación en el ambiente durante largo tiempo, la enfermedad puede manifestarse clínicamente e incluso ser fatal, pero es más frecuente la forma subclínica o asintomática; prevalece generalmente en machos, asociado esto probablemente al hábito de orinar por marcaje de territorio (Scialfa, 2021).

6.6.1. Patogenia

La bacteria ingresa al organismo a través del contacto directo con orina o tejidos infectados, e indirectamente por medio de agua o suelos contaminados, penetra por la piel erosionada, mucosas nasofaríngea, bucal, conjuntiva o genital (Luna *et al*. 2008). Por medio de la movilidad de estas bacterias y proteínas de adhesión, como las Proteínas de Membrana Externa (OMPs) y lipoproteínas, LipL32, LipL41 y LipL21, invaden los tejidos, en los cuales proliferan, producen toxinas y enzimas, hemolisinas esfingomielinasa (SphH) y fosfolipasa, enzima Catalasa KatE, junto con la respuesta inmune, ocasionan la lesión tisular, infección severa, fallo renal y hepático (Siuce, 2014).

Al ingresar al torrente sanguíneo, se multiplica en el parénquima del hígado, circula en sangre iniciando la fase de leptospiremia, que dura de 5-7 días, se observa fiebre, disnea, postración, daño funcional de hígado, riñón o bazo. Esta fase cesa con la aparición de anticuerpos, alrededor de los 10 días después de la infección, las beta-macro globulinas del suero y del complemento provocan la fagocitosis de Leptospira del torrente sanguíneo, localizándose en órganos como riñón, hígado, cámara anterior del ojo, útero grávido, aparato reproductor, sin embargo sobreviven en el riñón formando micro colonias en los túbulos renales en la proximidad de las micro vellosidades provocando daño capilar (nefritis) por la producción de ureasa de las Leptospiras, razón por la que son excretadas por largos periodos en la orina, lo que corresponde a la fase de leptospiruria (Pinta, 2020).

Se conoce como causante de daño renal, la serovariedad Canicola, que provoca nefritis, nefrosis o esclerosis renal destruyendo nefronas, produce acumulación de urea, creatinina y de otros productos de desechos casi en proporción con el número de nefronas destruidas, azotemia y uremia; la serovariedad Icterohaemorrhagiae ocasiona lesiones en el hígado, se da la acumulación de pigmentos biliares en los canalículos y ductos hepáticos debido a restos celulares que ocasionan oclusión, la ictericia se presenta en dependencia del grado de obstrucción; los serovares Icterohaemorrhagiae y Pomona producen hemolisinas que ocasiona hemoglobinuria en bovinos, equinos, porcinos y canideos (Luna *et al*., 2008).

6.6.2. Respuesta inmune

Leptospira patógena tienen la capacidad de evadir la fagocitosis y el sistema de complemento, por esto la respuesta inicial es dada por la inmunidad innata, con el reconocimiento de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs), como los Lipopolisacáridos (LPS), a través de los Receptores tipo Toll (TLR) (Siuce, 2014), se da la formación de inmunocomplejos y la liberación de citoquinas, logrando una respuesta específica mediante la producción de anticuerpos IgM e IgG (Pacheco, 2015).

La presencia de anticuerpos IgM indica que la infección es reciente, estos aparecen 4 a 6 días después de producida la infección, permaneciendo detectable durante unos meses; cuando se induce inmunidad por vacunación la IgM se produce de forma transitoria (Lizer *et al*., 2017).Esta respuesta coincide con la eliminación de Leptospira viva circulante en sangre y en la mayoría de los órganos, en infección natural hay un aumento de los títulos de anticuerpos IgM dentro de la semana posterior a la infección alcanzando su punto máximo 14 días después, mientras los títulos de IgG no se presentan hasta la segunda o tercera semana después de la infección alcanzando su punto máximo un mes después de la infección (Azocar *et al*., 2014).

6.6.3. Inmunidad vacunal

Las vacunas de Leptospira contienen células inactivadas de múltiples cepas, pero la protección se limita a los serovares que la conforman (Schuler & Marconi, 2021). Se asocia el desarrollo de la inmunidad protectora hacia Leptospira, con la opsonización y

anticuerpos bactericidas contra los lipopolisacáridos y antígenos proteicos asociados, las vacunas producen inmunidad para suprimir la invasión sistémica de los serovares aplicados, pero no previenen la colonización renal (Huerta, 2009).

Según Murcia *et al*. (2020), estudios experimentales confirman que la inmunización genera protección clínica a corto plazo, mientras autores como Wilson *et al*. (2013) y Klaseen *et al*. (2014) demuestran que se genera una inmunidad de hasta 12 meses.

Evaluaciones de títulos de anticuerpos en perros vacunados, con vacunas bivalentes y tetravalentes, muestran que los títulos disminuyen 4 meses después de la vacunación, aunque se han observado títulos altos persistentes que se asocia a exposición natural a serovares de campo de Leptospira (Spiri *et al*., 2017).

6.6.4. Signos clínicos

Los signos clínicos frecuentes en la inspección física son dolor a la palpación (renal), hipertermia, conjuntivitis, mucosas hiperémicas, letargo, anorexia, vómito, hemorragias, anuria, poliuria, diarrea, ictericia, convulsiones, disnea, poliuria, hipotermia, en varios casos se presentan cuadros subclínicos, septicémicos, agudos e infecciones crónicas (Caminoa, 2007).

La enfermedad en esta especie se puede presentar de forma aguda caracterizada por la presencia de anemia, ictericia, diarrea, fiebre, deshidratación, afectando al sistema renal y hepático mayormente, además puede tener un curso subagudo o crónico (Uribe, 2016). También se presenta en dependencia de factores del huésped, ya que puede ser accidental presentando la enfermedad aguda o severa; de mantenimiento presentando la enfermedad en forma crónica o subclínica (Alonso, 2020).

Según Morillo (2015), en los perros se consideran importantes dos serotipos, el Canicola relacionada con nefritis intersticial aguda, e Icterohaemorrhagiae que produce ictericia, hemorragia y afecta al hígado.

De acuerdo con Polo (2007), las formas de presentación y el curso de la Leptospirosis es el siguiente:

- **Curso latente o subclínico:** no se evidencian trastornos clínicos
- **Síndrome nefrítico-azotémico:** inicia con fiebre repentina de corta duración, apatía, inapetencia, vómito, diarrea, síntomas renales, uremia.
- **Síndrome ictérido:** se presenta con más frecuencia en animales jóvenes que en adultos, en animales con un curso agudo, sobreagudo y subagudo, aparece a veces precozmente en estado febril.
- **Síndrome gastrointestinal:** entre los signos más comunes están la apatía, puede haber tonsilitis, inyección de los vasos episclerales, vómito, diarrea, la temperatura puede ser normal o elevada, síntomas renales y hepáticos discretos, la urea moderadamente alta o normal.
- **Síndrome nervioso:** se ha observado en perros jóvenes con leves síntomas de nefritis, signos como trismos, accesos epileptiformes, ataxias, fenómenos de excitación psíquica, mielitis.

6.7.Pruebas diagnósticas

El diagnóstico de Leptospirosis incluye varios métodos entre los más comunes, Microscopia de Campo Oscuro (DFM), el diagnóstico serológico con técnicas como Ensayo de Inmunoanálisis Ligado a Enzimas (ELISA), Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT); cultivo de bacteria en sangre u orina; pruebas de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) entre otras (Galarde, 2017).

6.7.1. Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT)

MAT detecta anticuerpos aglutinantes en suero, por medio de antígenos activos que se mezclan in vitro, la muestra se examina en microscopio de campo oscuro para observar aglutinación y determinar el título de la muestra; para confirmar la infección se debe demostrar el aumento o disminución de cuatro veces en el título de anticuerpos, pero también el diagnóstico puede basarse en el cuadro clínico compatible a Leptospira sin vacunación reciente y títulos muy elevados; en pacientes con infección crónica que son portadores renales los título de MAT son mínimos por debajo de 1/100 (Lujan, 2019).

La técnica consiste en enfrentar el suero diluido con antígenos (cultivos vivos), de diversos serovares, esta suspensión de suero-antígeno se incuba a 37 ºC durante una hora, se realiza la lectura en microscopio de campo oscuro para observar aglutinación; se realiza una primera lectura con dilución de 1/100 para cada serovar, si hay aglutinación en esta etapa se determina el título para las serovariedades reaccionantes considerando como título final aquella que muestre una aglutinación de al menos el 50% (Moldes, 2017).

Esta técnica no diferencia anticuerpos aglutinantes por infección actual, reciente o pasada, tiene limitaciones si se interpretan títulos únicos, pueden presentar anticuerpos negativos en perros infectados que están en fase aguda de la enfermedad, debido al retraso de aparición de anticuerpos séricos, en perros vacunados con vacunas bivalentes o tetravalentes, pueden presentar títulos postvacunales de 1/6 400 o superior a serotipos tanto vacunales o no vacunales; también se ha demostrado que 15 semanas después de la vacunación los perros vacunados tienen anticuerpos negativos (Schuller *et al*., 2015).

6.7.2. Microscopía de campo oscuro (DFM)

Por medio de la prueba de campo oscuro es posible observar las espiroquetas en movimientos, es un método auxiliar para el diagnóstico de Leptospira (Busson, 2018), es un examen directo, para observar Leptospira en orina, sangre, líquido cefalorraquídeo o peritoneal, tiene una sensibilidad y especificidad baja, su sensibilidad baja se debe a que es necesario que haya 10^4 leptospiras por ml de muestra (Chiani, 2013), tiene una baja especificidad debido a la presencia de artefactos que pudieren estar presentes en la muestra (García & Fraile, 2017).

Basado en estudios se ha demostrado los siguientes porcentajes de sensibilidad y especificidad para DFM; comparando la técnica ELISA y DFM en casos clínicamente sospechosos de humanos, se demostró una especificidad del 61% y sensibilidad del 60%, con una eficacia del 95,8%, demostrando que la microscopía de campo oscuro es una herramienta que ayuda a un diagnóstico rápido, presuntivo, que hace necesario su uso en combinación con otras técnicas diagnósticas (Sharma & Kalawat, 2008).

Según Güven *et al*. (2016), en su estudio basado en la comparación de los métodos MAT, DFM y tres métodos PCR, realizados en muestras humanas y bovinas,

demostraron una sensibilidad para DFM del 22,27%, mientras la sensibilidad y especificidad del MAT fue de 82,43% y 94,92% respectivamente, PCR tuvo un 100% de sensibilidad y especificidad.

Un estudio realizado por Bojiraj *et al*. (2018) usando las técnicas DFM y PCR, demostró una positividad del 40% y 60% respectivamente, con una sensibilidad del 66,67% y especificidad de 100% de la DFM en comparación con PCR.

Un estudio realizado en humanos, mostró una sensibilidad para DFM de 55,55% frente a otras pruebas serológicas de diagnóstico como MAT (53,08%) ELISA IgM (65,43%), indicando que su sensibilidad fue mayor durante la fase aguda de la infección, y disminuyó durante la fase de convalecencia de la infección, mientras para MAT y ELISA IgM en esta fase su sensibilidad aumentó (Jaiswal, Chandrasekaran & Rukadikar, 2019).

6.8.Control y prevención

Entre las medidas de control dirigidas a contrarrestar la infección, se encuentra el control de roedores y animales silvestres que pueden ser portadores y diseminadores de la enfermedad (Romero, 2014); estas se deben basar en el cuidado del ambiente donde habita el animal y convive con el humano, es recomendable que el alimento solo esté disponible al momento del consumo, que los perros eviten aguas estancadas o lodosas, el contacto en sitios donde haya roedores (Huerta, 2009).

La inmunización es una estrategia de prevención, la vacunación contra Leptospira es una de las vacunas obligatorias, actualmente, existen vacunas bivalentes que contiene los serotipos Canicola e Icterohaemorrhagiae y tetravalentes que contiene cuatro serotipos principales, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa y Pomona; pero esto no asegura que no se infecte con otras cepas que no contiene la vacuna y contraiga la enfermedad (Alonso, 2020).

Es necesaria la revacunación, para mantener títulos de anticuerpos protectores (Pacheco, 2015), la protección aportada por bacterinas de célula completa es de alrededor 9 meses, por lo cual perros con mayor riesgo de infección requieren refuerzo dos veces al año (Huerta, 2009).

Según Gutiérrez (2010), se recomienda aplicar la vacuna a partir de la novena semana de edad, de manera que se evitan reacciones anafilácticas reduciendo la respuesta a otros antígenos en cachorros de 6 o menos semanas de edad, se repite la vacunación en intervalos frecuentes hasta obtener madurez inmunológica, y se opta por la revacunación cada seis meses. No se debe omitir que, a pesar de la importancia de la vacunación, ninguna de las bacterinas contra Leptospira evita el estado de portador, aun estando el animal protegido si tiene contacto con el microorganismo patógeno, no manifestará la enfermedad en forma clínica, pero sí podría eliminarla en la orina en periodos de tiempo variables, que pueden ser más cortos que en animales no vacunados.

VII. DISEÑO METODOLÓGICO

La investigación se realizó en tres cantones de la provincia de Manabí, en los centros de rescate "La Paska", "Joyssel rescata Dog-cat" del cantón Portoviejo; "Albergue Esperanza Canina", "El santuario canino de Gustavo" del cantón Manta y "Fundación del Perro Feliz" del cantón Sucre.

7.1.Modalidad y Tipo de Investigación

La investigación fue de tipo observacional, transversal, realizado durante los meses de Junio a Octubre del año 2021.

7.2.Población y muestra

La población son los perros censados de los centros de rescate de las ciudades Portoviejo, Manta y Bahía de Caráquez, los cuales fueron codificación, ver tabla1.

Tabla 1. Población de caninos de centros de rescate de los cantones Portoviejo, Manta y Sucre.

CIUDAD	ID		N
Portoviejo	A		100
	B		14
Manta	C		125
	D		130
Sucre	E		350
		Población total	719

Para el cálculo del tamaño de la muestra se aplicó la fórmula de proporción establecida por Thrusfield *et al*., 2018, asumiendo un nivel de confianza del 95%, una prevalencia esperada del 50% y un error del 5% obteniendo un total ajustado de 251 muestras, sin embargo, la muestra fue de 300 animales de los centros de rescate.

7.3.Tipo de muestreo

Se seleccionó a los animales a muestrear en cada centro de rescate, con un tipo de muestreo No probabilístico.

7.4. Toma de muestra y procesamiento

Se recolectó un total de 300 muestras sanguíneas y 48 muestras de orina, detallado en la tabla 2; la toma de muestras de sangre se realizó en machos y hembras mediante punción de la vena cefálica usando jeringas con aguja calibre 23 G de 3ml; la toma de muestra de orina se realizó solo en machos basándose en facilidad de manejo para la toma de muestra y por la capacidad de ser un diseminador de la infección tal como lo señalan Scialfa (2021), Arrieta *et al*. (2016), se utilizó la técnica de sondaje, mediante el uso de una sonda flexible calibre 6,5 french y jeringas de 10 ml, la cual se usó como reservorio y posterior transporte de la muestra hacia el laboratorio.

Las muestras se trasladaron a los Laboratorios Agropecuarios de la UTM y se procesaron en el Laboratorio de Leptospira el cual se encuentra ubicado en el cantón Santa Ana, parroquia Lodana, donde se separó el suero sanguíneo de las muestras y se almacenó a -20 ºC.

Tabla 2. Muestras de sangre y orina de caninos obtenidas en los centros de rescate.

MUESTREO			
		ORINA	
CENTROS DE RESCATE	**SANGRE**	Muestras logradas	Muestras fallidas (Vejiga vacía)
A	69	6	2
B	14	1	0
C	62	22	5
D	58	13	4
E	97	6	10
TOTAL	300	48	21

7.5.Técnicas diagnósticas

7.5.1. Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT)

Se utilizó un panel diagnóstico integrado por 9 serovares de Leptospira patógena descritos en la tabla 3. Se utilizó un punto de corte al MAT de 1:100 para declarar a la muestra positiva. El serovar positivo para una muestra fue aquel que resultó con el título más alto en el MAT.

Tabla 3. Serovares de Leptospira disponibles en el laboratorio de Leptospira de la UTM.

N cepas	Especie	Serogrupo	Serovar	Cepas
1	*L. interrogans*	Australis	Australis	Ballico
2		Bataviae	Bataviae	Van tienen
3		Canicola	Canicola	Hound Utrecht IV
4		Pomona	Pomona	Pomona
5		Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
6			Wolffii	3705
7	*L. borgpetersenii*	Sejroe	Sejroe	M84
8		Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin
9			Castellonis	Castellón 3

Las muestras fueron procesadas siguiendo el procedimiento descrito por Medrano *et al*. (2011) y Faine *et al.* (1999).

La técnica consistió en realizar una dilución de los sueros sanguíneos almacenados, colocando en un eppendorf 600 µl de suero fisiológico y 25 µl del suero sanguíneo, se realizó una evaluación serológica inicial o tamizaje, se usó una microplaca donde se adicionó 100 µl de suero fisiológico en los pocillos de la fila A (control) y 50 µl a partir de la fila B en adelante, se colocó 50 µl de la dilución del suero sanguíneo y 50 µl de antígeno, se procedió a incubar durante una hora a 37°C en incubadora marca Memmert, posteriormente se visualizó en microscopio modelo MBL2000 marca A. Krüss, con condensador de campo oscuro (NA 0,7 – 0,9) a 100X.

Las muestras que presentaron aglutinación fueron evaluadas en titulación para determinar la cantidad de títulos presentes en determinados serovares; en la microplaca se colocó el suero fisiológico en cada pocillo al igual que en la evaluación inicial, se adicionó 50 µl de suero sanguíneo a partir de la fila B haciendo una dilución, a partir de este pocillo se obtuvieron 50 µl llevándolo al pocillo inferior y así sucesivamente, eliminando los 50 µl restante, se colocó 50 µl de antígeno desde la fila control y las posteriores, se incubó por una hora a 37°C, luego se realizó la observación en el microscopio de campo oscuro a 100X.

7.5.2. Microscopía de Campo Oscuro (DFM)

La microscopía de campo oscuro es una técnica de diagnóstico rápido ha sido útil para la observación de espiroquetas (González, 2003). En el caso de que la prueba sea positiva se observan estructuras similares a espiroquetas con movimientos característicos de Leptospira (Dangond *et al*., 2015).

Para la realización del DFM se colocó sobre un portaobjeto una gota de la muestra de orina y se procedió a colocar un cubreobjeto, se realizó la observación en el microscopio de campo oscuro observado a 100X.

Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva utilizando tablas y gráficos para explicar el comportamiento de los serovares. Para comparar las proporciones de casos positivos al MAT y al DFM se utilizó la prueba de Fisher tomando en cuenta un p valor igual o inferior a 0,05, se realizó cálculo de los Intervalos de Confianza al 95% para cada proporción, como estimador del riesgo se usó la medida de asociación Odds Ratio o Razón de Momios, para el cálculo de la prevalencia se utilizó la siguiente fórmula:

Prevalencia= (Nº de animales positivos al test diagnóstico /Total de animales muestreados) %100

VIII. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

8.1. Muestras sanguíneas de caninos extraídas en centros de rescate de Manabí.

De un total de 300 muestras de sangre, el 69,3% (208) provenían de animales hembras y el 30,6% (92) de machos, distribuidos en la tabla 4 por centro de rescate y número de muestras obtenidas.

Tabla 4. Distribución por sexo de las muestras sanguíneas obtenidas en los centros de rescate estudiados en la provincia de Manabí

CENTROS DE RESCATE	Hembras	Machos	Total	Porcentaje %
A	57	12	69	23,0
B	11	3	14	4,6
C	35	27	62	20,6
D	37	21	58	19,3
E	68	29	97	32,3

Se observó que 85,7% de los individuos muestreados presentó antecedentes de vacunación contra leptospira entre 2 semanas a 10 meses previo al muestreo, y un 14,3% no presentó antecedentes de vacunación contra leptospira ver tabla 5.

Tabla 5. Distribución de muestras sanguíneas según inmunidad en los centros de rescate estudiados en la provincia de Manabí

CENTROS DERESCATE	Vacunados	Porcentaje %	No Vacunados	Porcentaje %
A	60	87,0	9	13,0
B	14	100,0	0	0,0
C	50	80,6	12	19,4
D	36	62,1	22	37,9
E	97	100,0	0	0,0
TOTAL	257	85,7	43	14,3

8.2. Prevalencia de Leptospira patógena en centros de rescate canino de Manabí.

La prevalencia encontrada en los centros de rescate mediante la Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT) fue del 27,0% (82/300).

Tabla 6. Distribución de casos reaccionantes a Leptospira patógena según la Técnica de Aglutinación Microscópica.

RESULTADOS	n	Porcentaje%	IC95%
Positivo	82	27,0	22,3 – 32,4
Negativo	218	73,0	67,6 – 77,7
Total	300	100,0	

8.2.1. Distribución de casos positivos a Leptospira patógena según MAT en los diferentes centros de rescate

De los centros de rescate evaluados mediante la Técnica de Aglutinación Microscópica, se presentó diferencia significativa entre las proporciones de animales positivos al MAT entre los centros de rescates, hallando que el centro de rescate "C" con una mayor proporción de positivos presentó diferencia significativa con respecto a "A" y "B" y no presentó diferencia frente a "D" y "E".

Tabla 7. Positividad a Leptospira en los distintos centros de rescate según MAT.

CENTROS DE RESCATE	Positivos/n	Porcentaje %	IC95%
A	12/69	17,4	8,4 – 26,3
B	1/14	7,1	-6,3 – 20,6
C	25/62	40,3	28,1 – 52,5
D	14/58	24,1	13,1 – 35,2
E	30/97	30,9	21,8 – 40,1

Prueba de Fisher p valor = 0,01433

8.2.2. Distribución de casos positivos a Leptospira patógena según MAT de acuerdo con el sexo.

En relación con el sexo se identificó que hay diferencia significativa entre las proporciones de machos y hembras positivos al MAT, evidenciando que existe mayor probabilidad de exposición en machos 38,0% que en hembras 22,6%. De acuerdo al Odds ratio se halló un grado de asociación, presentando los machos 2,1 veces más chance de presentar exposición a Leptospira patógena que las hembras.

Tabla 8. Positividad a la Técnica de Aglutinación Microscópica según el sexo.

Sexo	Positivos/n	Porcentaje%	IC95%
Hembras	47/208	22,6	16,9 – 28,3
Machos	35/92	38,0	28,1 – 47,9

Prueba de Fisher p valor = 0,00747
Odds Ratio = 2,1 (IC95% 1,2 – 3,56)

Sin embargo, al evaluar cada centro de rescate, se evidenció mediante intervalos de confianza diferencia entre las proporciones de machos y hembras positivos al MAT en el centro C, el cual mostró mayor positividad en machos 59,3% que en hembras 25,71%.

Tabla 9. Positividad a la Técnica de Aglutinación Microscópica según el sexo en los diferentes centros de rescate

CENTROS DE RESCATE	HEMBRAS			MACHOS		
	Positivos/n	%	IC95%	Positivos/n	%	IC95%
A	9/57	15,8	6,3 – 25,3	3/12	25,0	0,5 – 49,5
B	1/11	9,1	-7,9 - 26,1	0/3	0,0	0,0 – 0,0
C	9/35	25,7	11,2 – 40,2	16/27	59,3	40,7 - 77,8
D	8/37	21,6	8,4 – 34,9	6/21	28,6	9,25 – 47,9
E	20/68	29,4	18,5 – 40,2	10/29	34,5	17,2 – 51,8

8.2.3. Distribución de casos positivos a Leptospira patógena según MAT de acuerdo al antecedente de vacunación.

De los 300 individuos en estudio 257 tiene antecedentes de vacunación y 43 no presentaron antecedentes de vacunación contra Leptospira. Se encontró que no hay diferencias entre las proporciones, evidenciando que se presentaron anticuerpos contra Leptospira tanto en perros que fueron vacunados y aquellos que no lo estaban. No se halló un grado de asociación OR= 0,8 entre el factor causal (ser vacunado o no) con la exposición a Leptospira patógena.

Tabla 10. Positividad a la Técnica de Aglutinación Microscópica según el antecedente de vacunación.

Inmunidad	Positivos/n	Porcentaje%	IC95%
Vacunados	69/257	26,84	21,4 – 32,3
No vacunados	13/43	30,23	16,5 – 43,9

Prueba de Fisher p valor = 0,7119
Odds Ratio = 0,8 (IC95% 0,4 – 1,7)

Al evaluar cada centro de rescate no se halló diferencia entre las proporciones de vacunados y no vacunados, sin embargo, se identificó que el centro C tiene una mayor proporción de casos positivos a MAT en perros que se vacunaron frente a los que no se vacunaron.

Tabla 11. Distribución de casos positivos a MAT por centro de rescate según el antecedente de vacunación.

CENTRO DE RESCATE	VACUNADOS			NO VACUNADOS		
	Positivos/n	%	IC95%	Positivos/n	%	IC95%
A	9/60	15,0	5,9 – 24,0	3/9	33,3	2,5 – 64,1
B	1/14	7,1	-6,3 – 20,6	0/0	0,0	0,0 – 0,0
C	24/50	48,0	34,1 – 61,8	1/12	8,3	-7,3 – 23,9
D	5/36	13,9	2,6 – 25,2	9/22	40,9	20,3 – 61,5
E	30/97	30,9	21,7 – 40,1	0/0	0,0	0,0, - 0,0

8.3. Frecuencia de serovares de Leptospira patógena en centros de rescate canino de la provincia de Manabí.

Se evidenció que los serovares más frecuente fueron Canicola con un 11,0%; Castellonis con el 8,7%; Australis 7,7%; Sejroe 7,0%; Tarassovi 5,7%; Wolffii 5,3% y Bataviae 5,0% entre los cuales no se mostró diferencia significativa; Hardjo con el 4,7% presentó diferencia frente a Canicola, pero no para el resto de serovares, siendo el menos frecuente Pomona con el 0,7%.

Tabla 12. Frecuencia de serovares de Leptospira patógena según MAT.

SEROVARES	N	PORCENTAJE %	IC95%
Sejroe	21	7,0	4,11 – 9,89
Canicola	33	11,0	7,46 – 14,54
Tarassovi	17	5,7	3,05 – 8,28
Hardjo	14	4,7	2,28 – 7,05
Bataviae	15	5,0	2,53 – 7,47
Wolffii	16	5,3	2,79 – 7,88
Pomona	2	0,7	0,25 – 1,59
Australis	23	7,7	4,66 – 10,68
Castellonis	26	8,7	5,48 – 11,85

Al observar los serovares que se presentaron en cada centro de rescate se evidenció que el centro E presentó aglutinación para todos los serovares, los centros A y C tuvieron aglutinación para 8 serovares, el D para 6 y en el B se presentó solo el serovar Sejroe.

Tabla 13. Distribución de serovares observados en cada centro de rescate canino

SEROVARES	CENTRO DE RESCATE									
	A		B		C		D		E	
	n	%	n	%	n	%	N	%	n	%
Sejroe	0	0,0	1	7,1	7	11,2	5	8,6	8	8,2
Canicola	4	5,7	0	0,0	11	17,7	6	10,3	12	12,4
Tarassovi	3	4,3	0	0,0	3	4,8	1	1,72	10	10,3
Hardjo	2	2,8	0	0,0	3	4,8	0	0	9	9,3
Bataviae	1	1,4	0	0,0	3	4,8	2	3,4	9	9,3
Wolffii	1	1,4	0	0,0	7	11,2	0	0,0	8	8,2
Pomona	1	1,4	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,0
Australis	3	4,3	0	0,0	7	11,2	3	5,2	10	10,3
Castellonis	3	4,3	0	0,0	11	17,7	2	3,4	10	10,3

8.4. Títulos más altos reaccionantes a serovares patógenos según Técnica de Aglutinación Microscópica.

Se cuantificó los títulos más altos reaccionantes a los serovares patógenos, obteniendo títulos de 1:100 en un 58,6%, de 1:200 con el 24,1% y 1:400 con el 17,2%.

Tabla 14. Títulos de anticuerpos contra serovares de Leptospira patógena según MAT.

SEROVARES	TITULO			TOTAL
	1:100	1:200	1:400	
Sejroe	4	1	0	5
Canicola	9	3	5	17
Tarassovi	5	1	0	6
Hardjo	1	0	0	1
Bataviae	1	1	2	4
Wolffii	2	3	2	7
Pomona	0	1	0	1
Australis	4	1	0	5
Castellonis	8	3	1	12
Número	34	14	10	58
Porcentajes	58,6%	24,1%	17,2%	

8.5. Serovares de Leptospira patógena que co-aglutinaron con mayor frecuencia.

En el estudio se halló un 37,8% (31/82) de co-aglutinación; el 67,7% de estas co-aglutinación se dio entre dos serovares; 16,1% entre tres serovares; 12,9% entre cuatro serovares y el 3,2% entre cinco serovares, siendo Canicola el que se encontró presente en la mayor cantidad de co-aglutinaciones frente a otros serovares, siendo las combinaciones más frecuentes: Canicola-Australis y Sejroe-Australis. El 64,5% de las co-aglutinaciones presentaron títulos de 1:100; el 32,2% con títulos de 1:200 y el 3,2% títulos de1:400.

Tabla 15. Serovares co-aglutinantes y sus títulos de anticuerpos por MAT.

COAGLUTINACIÓN	SEROVARES	n	%	TÍTULOS		
				1:100	1:200	1:400
Canicola+Hardjo	2	21	67,7	1		
Canicola+Tarassovi				1		
Canicola+Bataviae					2	
Canicola+Sejroe				2		
Canicola+Wolffi					1	
Canicola+Australis				3		
Sejroe+Wolffi					1	1
Sejroe+Australis				2	1	
Sejroe+Bataviae				1		
Tarasovi+Castellonis				1		
Hardjo+Bataviae				1		
Hardjo+Tarassovi				1		
Wolffi+Australis				1		
Australis+Castellonis				1		
Canicola+Hardjo+Tarassovi	3	5	16,1		1	
Hardjo+Bataviae+Castellonis				1		
Hardjo+Bataviae+Australis					1	
Hardjo+Sejroe+Castellonis					1	
Wolffi+Australis+Castellonis					1	
Canicola+Bataviae+Australis+ Castellonis	4	4	12,9	1		
Canicola+Hardjo+Bataviae+Australis				1		
Sejroe+Bataviae+Wolffi+Australis				1		
Tarasovi+Sejroe+Wolffi+Castellonis				1		
Hardjo+Tarassovi+Sejroe+Bataviae +Australis	5	1	3,2		1	
TOTAL		31	100,0	20	10	1
PORCENTAJE				64,5%	32,2%	3,2%

8.6.Muestras de orina extraídas en caninos de centros de rescate de Manabí.

Se realizó la extracción de muestras de orina en los caninos de los diferentes centros de rescate, seleccionando solo machos, obteniendo un total de 48 muestras que representó el 52,2% de la muestra del total de machos muestreados en el presente estudio, ver la tabla 16.

Tabla 16. Distribución de muestras de orina en los centros de rescate

CENTROS DE RESCATE	n	Total	Porcentaje %
A	6	12	50,0
B	1	3	33,3
C	22	27	81,5
D	13	21	61,9
E	6	29	20,7

8.7. Eliminación urinaria de estructuras compatibles con Leptospira según la técnica de Microscopía de Campo Oscuro.

En 22/48 muestras de orina se observó estructuras similares a Leptospira, obteniendo un 45,8% de positividad mediante la técnica de Microscopía de Campo Oscuro (DFM).

Tabla 17. Positividad mediante el uso de la Microscopía de Campo Oscuro en muestras de orina.

RESULTADOS	n	Porcentaje%	IC95%
Positivos	22	45,8	31,7 – 59,9
Negativos	26	54,2	40,1 – 68,3
Total	48	100,0	

8.7.1. Distribución de casos positivos a DFM en los diferentes centros de rescate.

Se evidenció que estadísticamente hay diferencia significativa entre las proporciones de casos positivos a Microscopía de Campo Oscuro, del centro de rescate A frente al E, pero estos no presentaron diferencia frente a los centros B, C y D.

Tabla 18. Positividad a DFM en muestras orina en los diferentes centros de rescate.

CENTROS DE RESCATE	Positivos/n	Porcentaje %	IC95%
A	1/6	16,7	-13,2 – 46,5
B	0/1	0,0	0,0 – 0,0
C	9/22	40,9	20,4 – 61,5
D	7/13	53,8	26,7 – 80,9
E	5/6	83,3	53,5 – 113,2

8.7.2. Distribución de casos positivos a DFM según el antecedente de vacunación.

Se evidenció la presencia de estructuras similares a Leptospira en orina, tanto de animales vacunados y no vacunados, demostrando que no hay diferencia significativa entre las proporciones, y por medio del análisis de OR no se halló un grado de asociación entre el factor inmunidad y la presentación de estructura compatible con Leptospira.

Tabla 19. Positividad mediante el uso de la Microscopía de Campo Oscuro según el antecedente de vacunación.

Inmunidad	Positivos/n	Porcentaje%	IC95%
Vacunados	20/40	50,0	34,5 – 65,6
No vacunados	2/8	25,0	5,0 - 55,0

Prueba de Fisher p valor = 0.4879
Odds Ratio = 3,0 (IC95% 0,54 – 16,5)

IX. DISCUSIÓN

En esta investigación se buscó determinar la prevalencia de Leptospira patógena y su capacidad infecciosa en centros de rescate canino de la provincia de Manabí; al ser los caninos una fuente importante en la propagación de Leptospira, cumplen el rol de diseminar y mantenerla en el medio ambiente, se considera que los perros de refugios al tener un estatus sanitario desconocido y en su mayoría han tenido una vida callejera han estado más expuestos a factores que propician el contacto con la bacteria, y como señala Moraes *et al*. (2020) esto supone un riesgo entre los perros alojados en el refugio, trabajadores, adoptantes, y un problema para la salud pública.

Se evidenció una prevalencia del 27,0%, mayor a la observada en EEUU y Brasil que correspondieron al 18,0% (Spangler *et al*., 2020) y 13,4% (Moraes *et al*., 2020) respectivamente, sin embargo, otros estudios reportaron prevalencias superiores del 30,8% (Gay *et al*., 2014) y 43,0% (Roqueplo *et al*., 2013) en Nueva Caledonia; prevalencias bajas o altas distintas a nuestro estudio muestran diferencias en la distribución geográfica de Leptospira y el riesgo de exposición en determinado territorio, como la prevalencia alta en las islas de Nueva Caledonia que al formar parte de las islas del Pacifico Sur se caracterizan por un clima cálido que contribuye a la supervivencia de la bacteria y donde Leptospira es endémica. Se atribuye la prevalencia obtenida en este estudio a que en la provincia de Manabí existen las condiciones climáticas idóneas para el desarrollo de Leptospira (Zambrano *et al*., 2017).

Estadísticamente en la población muestreada la proporción de casos positivos a MAT fue diferente en cuanto al sexo siendo los machos los que obtuvieron una mayor proporción y quienes representaron un grado de asociación mayor que las hembras al analizar OR, al evaluar cada centro de rescate se observó diferencia significativa en el centro de rescate C, donde hubo mayor positividad en machos; similar a lo reportado por Arrieta *et al*. (2016) que halló una mayor sero-reactividad en machos que en hembras, sin embargo otros estudios por Álvarez *et al*. (2011) y Tummers *et al*. (2013), demuestran que no hay diferencia significativa en cuanto al sexo; esta mayor proporción de machos positivos se puede asociar a patrones de comportamiento como olfatear y lamer genitales de otros perros (Martínez *et al*., 2016), la micción características del macho en superficies que le permiten el contacto con estas y olfateo de las mismas para

reconocimiento territorial, teniendo mayor contacto con orina la cual es el medio de eliminación de Leptospira (Pineda *et al*., 1996).

Considerando el estado inmune de los perros, mediante las técnicas MAT y DFM se observó que no hay diferencia significativa entre las proporciones de perros vacunados y no vacunados, Wilson *et al*. (2013) señala que los anticuerpos postvacunales se muestran a los 21 días alcanzando el punto máximo entre la 3ra a 6ta semana y estos van disminuyendo en los siguientes 12 meses; asociando de esta forma que los perros vacunados que se mostraron positivos, presentaron títulos de anticuerpos influenciados por una previa vacunación, o por exposición continua a cepas, que mantienen la persistencia de anticuerpos (Sykes *et al*., 2010); de igual forma en aquellos perros no vacunados puede haber una exposición continua a cepas que se encuentran circulando en los centros de rescate.

Por otra parte, la reacción a serovares que no presentaron protección por vacuna puede asociarse de acuerdo a lo descrito por Murcia *et al*. (2020) que en caso de presentarse títulos bajos de MAT puede relacionarse a aglutinación cruzada entre serogrupos, y títulos altos se pueden observar después de enfermedad aguda o infección crónica. Saldivia *et al*. (2009) señala que al darse infección por serogrupos no vacunales el perro puede producir anticuerpos frente a este, días antes que un perro no vacunado debido a la rápida respuesta a cepas virulentas proporcionada por la vacuna. Sin embargo, al presentarse en este estudio un porcentaje considerable de co-aglutinación y mayor presentación de títulos de anticuerpos bajos (1:100), se puede relacionar que la reacción positiva a serovares no vacunales puede estar relacionada a reacción cruzada, pero no se descarta la exposición a otras cepas patógenas.

Se usó un panel diagnóstico de nueve serovares, estadísticamente no se evidenció diferencia significativa entre los serovares más observados, Canicola 11%, Castellonis 8,7%; Australis 7,7%; Sejroe 7,0%; Tarassovi 5,7%; Wolffii 5,3% y Bataviae 5,0%; a excepción con Pomona 0,7% y Hardjo 4,7% frente a Canicola; de forma similar en otras investigaciones realizadas en el país por Velázquez y Garzón (2020), Carreño y Cedeño (2014), Chuva y Yunga (2019), entre los serovares más identificados se encuentra Canicola; a diferencia de este estudio otro autores como Intriago (2021), Lazcano *et al*. (2017), reportan a Pomona como el más frecuente; se atribuye que Canicola lidere entre los serovares más frecuentes, ya que se considera al perro huésped de mantenimiento de

este serovar (Sykes *et al*., 2010) por lo cual es común encontrarlo entre los más frecuentes para la especie canina.

Se obtuvo una co-aglutinación de serovares del 37,8%, siendo la co-aglutinación más común Canicola-Australis y Sejroe-Australis, otros estudios muestran patrones de co-aglutinación diferente, como el reportado por Álvarez *et al*. (2011) con Icterohaemorrhagiae-Grippothyphosa; Siuce (2014) reportó el patrón Canicola-Iquitos y Martínez *et al*. (2016) Canicola-Icterohaemorrhagiae; esta reacción puede estar relacionada a la reactividad cruzada debido a que los anticuerpos reaccionan contra serovares del mismo serogrupo (Levett, 2001) o se produce cierta reactividad cruzada entre serogrupos, por los antígenos compartidos entre los mismos (Rodríguez *et al*., 2004).

Resultados positivos a DFM en perros vacunados puede estar asociado a que, aunque la vacuna proporciona inmunidad, reduce el riesgo de infección y aporta protección para determinados serogrupos no evita el estado de portador (Wilson *et al*., 2013), ya que la inmunidad generada ayuda a suprimir la invasión sistémica pero no evita la colonización renal (Huerta, 2009) y de igual forma en perros no vacunados que tienen exposición a cepas de Leptospira y con probabilidad de infectarse pueden desarrollar la enfermedad, eliminar la bacteria en orina o llegar a convertirse en portadores asintomáticos, como señala Miotto *et al*. (2018) los perros de calle y de refugios se consideran más susceptibles por su mayor grado de exposición a la bacteria.

Se evidenció mediante DFM estructuras compatibles con Leptospira, con movimientos característicos de la bacteria, en orina de perros en un 45,8%, similar a los resultados reportados en la India por Bojiraj *et al*. (2018) que evidenció un 40% de positividad; y el reportado por Krishna *et al*. (2012) con un 50% de positividad; el comportamiento social del perro de lamer u olfatear genitales o superficies, los hace más susceptibles a organismos patógenos (Caminoa, 2007), pudiendo infectarse y convertirse en diseminador de la bacteria a través de la orina (Botero & Rodríguez, 2014), por lo cual se asocia que este comportamiento en machos además del marcaje territorial característico, son un punto a favor que los convierte en una fuente de diseminación de Leptospira, contribuyendo a la contaminación y permanencia del organismo en el ambiente.

X. CONCLUSIONES

La Técnica de Aglutinación Microscópica permitió evidenciar una prevalencia de exposición a Leptospira patógena del 27% en perros de centros de rescate de la provincia de Manabí, debido a que posiblemente los canes de estos centros son más susceptibles por sus condiciones de vida previa, lo que los ha llevado a un mayor grado de exposición a Leptospira.

Al evaluar la seroprevalencia por sexo se halló que los machos fueron más seropositivos que las hembras y representan un mayor grado de asociación por su comportamiento de olfateo y marcaje de territorio.

Usando un panel diagnóstico de nueve serovares se observó serorreacción en todos y se halló que los serovares más frecuentes fueron Canicola, Castellonis, Australis, Sejroe, Tarassovi, Wolffii y Bataviae; la diversidad de serovares observada en los centros de rescate fue mayor en el centro E que presentó todos los serovares a diferencia del B que solo presentó un serovar.

Se logró identificar en el estudio estructuras compatibles con Leptospira en orina en un 45,8% mediante la técnica de Microscopía de Campo Oscuro, indicando así la probabilidad de que los perros de refugios estén eliminando la bacteria, pudiendo ser portadores activos y riesgo potencial en la transmisión de la enfermedad.

XI. RECOMENDACIONES

Seguir realizando serología mediante MAT en centros de rescate canino e implementar en el panel diagnóstico otros serovares también comunes en perros para identificar su exposición frente a estos.

Es muy importante que se implementen estudios con pruebas diagnósticas directas como PCR que permitan reconocer Leptospira patógena en los caninos de centros de rescate, y determinar si se da la presencia de la enfermedad en los refugios.

A si mismo se deben realizar estudios que determinen con mayor sensibilidad y especificidad la eliminación de Leptospira en orina, que demuestre la capacidad infecciosa de los perros en los centros de rescate, ya que ellos cumplen un rol importante dentro de la epidemiología de transmisión de la enfermedad.

XII. PRESUPUESTO

Cant.	DESCRIPCIÓN	TOTAL
600	Jeringuillas Desc. Vanjerin 3cc 23x1”	$ 34,80
500	Jeringuillas Desc. Bcg 10cc 21 x 1 ¼ SAFTI	$ 44,65
3	Puntas amarillas x 1000 UND	$ 18,75
4	Puntas azules x 500 UND	$ 18,93
4	Tubos eppendorf 1.5ml x 500 UND	$ 15,20
3	Laminas cubre objeto L. Glass lujo 22x22x200	$ 8,04
3	Laminas porta objeto renonlab x 50 UND	$ 3,75
2	Tubos T/roja Vidrio 10 ml x 50 UND	$ 40.00
90	Sondas nasogástricas 6.5	$ 39.95
4	Guantes Latex medident “M” x 100 UND	$ 20,00
3	Guantes Latex Small “S” x 100 UND	$ 15,00
1	Algodón	$ 7,00
2	Bozales	$ 10,00
2	Alcohol	$ 5.00
2	Marcadores pizarra liquida	$ 1.00
2	Marcadores permanentes	$ 4.00
1	Tablero	$ 3.00
	Transporte y alimentación	$ 280.00
	Impresiones	$ 10.00
	Empastado	$ 30.00
	TOTAL	$ 609,07

XIII. CRONOGRAMA VALORADO

ACTIVIDADES	PERIODO EN MESES											
	2021							2022				
	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo
Compra de materiales	X											
Estudio de campo (muestreo)	X X	X X X X	X X X X	X X X X	X							
Procesamiento de muestras					X X X X							
Análisis, redacción de resultados y discusión						X X X X						
Redacción de informe final de tesis							X X X X	X X				
Revisión de tesis									X X			
Asignación del tribunal de defensa										X		
Defensa de tesis												X

XIV. BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta, H., Moren, C., & Viáfara, D. (1994). Leptospirosis Revisión de Tema. Colombia Medica, 25(1), 36-42. https://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/1783

2. Ahmad, S.N., Shah, S., & Ahmad, F.M. (2005). Laboratory Diagnosis of Leptospirosis. Journal of Postgraduate Medicine, 51(3), 195-200. https://www.jpgmonline.com/text.asp?2005/51/3/195/19020

3. Alonso, M. (2020). Leptospirosis canina y su importancia diagnóstica [tesis de pregrado, Universidad Cooperativa de Colombia]. Repositorio Institucional UCC. http://hdl.handle.net/20.500.12494/20251

4. Álvarez, L., Calderón, A., Rodríguez, V., & Arrieta, G. (2011). Seroprevalencia de Leptospirosis canina en una comunidad rural del Municipio de Ciénaga de Oro, Córdoba (Colombia). Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, 14(2), 75-81. https://doi.org/10.31910/rudca.v14.n2.2011.777

5. Altheimer, K., Jongwattanapisan, P., Luengyosluechakul, S., Pusoonthornthum, R., Prapasarakul, N., Kurilung, A., Broens, E., Wagenaar, J., Goris, M., Ahmed, A., Pantchev, N., Reese, S. & Hartmann, K. (2020). Leptospira infection and shedding in dogs in Thailand. BMC Veterinary Research, 16(89). https://doi.org/10.1186/s12917-020-2230-0

6. Arrieta, G., Calderón, A., Rodriguez, V., Alvarez, J., & Mattar, S. (2016). Presencia de anticuerpos contra *Leptospira interrogans* (sensulato) en caninos semidomésticos en Sincelejo, Sucre (Colombia). Revista Veterinaria y Zootecnia, 10(1), 89-103, 2016. https://doi.org/10.17151/vetzo.2016.10.1.7

7. Azocar, L., Smits, H., & Monti, G. (2014). Leptospirosis in dogs and cats: epidemiology, clinical disease, zoonotic implications and prevention. Archivos de Medicina Veterinaria 46(3), 337-348. http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0301-732X2014000300002&lng=es&nrm=iso&tlng=

8. Bautista, B., Bulla, D., López, H., Diaz, A., & Pulido, M. (2019). Leptospirosis: enfermedad de importancia en salud pública. Revista Colombiana de Ciencia Animal Recia, 11(2), 727. https://doi.org/10.24188/recia.v11.n2.2019.727

9. Bojiraj, M., Porteen, K., Gunaseelan, L. & Suresh, S. (2018). Diagnosis of Leptospirosis in Animals and Human by Dark Field Microscopy and Polymerase Chain Reaction. International Journal of Livestock Research, 8(5), 172-183. http://dx.doi.org/10.5455/ijlr.20171108103203

10. Botero, A., & Rodríguez, G. (2014). Detección de *Leptospira spp*. en orina de caninos expuestos a factores de riesgo mediante la utilización de la técnica molecular PCR. [Tesis de maestría, Universidad de La Salle]. https://ciencia.lasalle.edu.co/maest_ciencias_veterinarias/37/

11. Budihal, S. V., & Perwez, K. (2014). Leptospirosis diagnosis: competancy of various laboratory tests. Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR, 8(1), 199–202. https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/6593.3950

12. Busson, S. (2018). Leptospirosis canina: el camino hacia la insuficiencia renal crónica. [Tesis de titulación, Universidad Nacional de Rio Negro]. Repositorio digital UNRN. http://rid.unrn.edu.ar/handle/20.500.12049/689

13. Carreño, M., & Cedeño, G. (2014). Determinar la infección por *Leptospira spp*. en perros de la parroquia Calderón de la Provincia de Manabí en el año 2013. [tesis de grado, Universidad Técnica de Manabí]. Repositorio UTM. http://repositorio.utm.edu.ec/handle/123456789/1495

14. Cano, C. (2012). Caso clínico de Leptospirosis en un canino. [tesis de grado, Corporación Universitaria Lasallista]. Repositorio Digital. http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/689/1/CASO_CLINICO_LEPTOSPIROSIS_CANINO.pdf

15. Campos, N. (2014). Leptospirosis Reporte de un caso. Medicina Legal de Costa Rica 31(2), 112-118. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152014000200012

16. Caminoa, R. (2007). Leptospirosis Canina (Informe técnico Nº 1). Intervet Argentina S.A. https://www.msd-salud-animal.com.ar/wp-content/uploads/sites/44/2020/01/Informe_leptospirosis_tcm55-33327.pdf

17. Chiani, Y. (2013). Desarrollo y validación de técnicas diagnósticas de Leptospira canina. [tesis de maestría, Universidad Nacional del Litoral]. Biblioteca Virtual http://hdl.handle.net/11185/434

18. Chuva, P., & Yunga, J. (2019). Seroepidemiología y análisis espacial para caracterizar los factores de riesgo para leptospirosis canina en las haciendas y domicilios de tres comunidades de Tarqui. [tesis de titulación, Universidad de Cuenca]. Repositorio institucional. http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/32044

19. Cilios, G., Bertelloni, F., & Fratini, F. (2020). Leptospira Infections in Domestic and Wild Animals. Pathogens, 9(7), 573. https://doi.org/10.3390/pathogens9070573

20. Cruz, A., Romero, D., Ahuja, C., Aguilar, M. & Bautista, C. (2013). Frecuency of canine leptospirosis in dog shelters in Veracruz, Mexico. African Journal of Microbiology Research, 7(16), 1518-1521. https://www.researchgate.net/publication/236334797

21. Dangond, M., & Gutiérrez, K. (2015). Detección serológica y por campo oscuro de *Leptospira spp.* en yeguas criollas colombianas ubicadas en predios del departamento de Cundinamarca. [tesis de titulación, Universidad de la Salle]. Repositorio Digital. https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/52

22. Faine, S., Alder, B., Bolin, C., Perolat, P., (1999). Leptospira and Leptospirosis. MediSci Press, Melbourne.

23. Galarde, M. (2017). Factores de riesgo asociados a leptospirosis en trabajadores de establos y población canina que cohabitan en el Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, Hidalgo; México. [tesis de titulación, Escuela de Salud Pública de México]. Biblioteca José Luis Bobadilla. https://catalogoinsp.mx/files/tes/55519.pdf

24. García, F., & Fraile, L. (2017). Diagnóstico clínico y de laboratorio de la leptospirosis porcina. MSD Animal Healt. http://recursoscongresovirtual.com/produccion/pdf/porcino/Diagn%C3%B3stico%20de%20la%20leptospirosis%20porcina%20.pdf

25. García de la Peña, J. (2014). La Leptospirosis, y sus efectos en los animales. Sitio Argentino de Producción Animal: https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/comun_varias_especies/64-Leptospirosis.pdf

26. Gay, N., Soupé, M., & Goarant, C., (2014). Though not Reservoirs, dog might transmit Leptospira in New Caledonia. International Journal of Evironmental Research and Public Health, 11(4), 4316-4325. https://doi.org/10.3390/ijerph110404316

27. González. A., (2003). Microscopía de campo oscuro aplicada a muestras de orina. Revista Médica Electrónica. 25 (3). http://www.revmedicaelectronica.sld.cu/index.php/rme/article/view/94

28. Gutiérrez, J. (2010). Inmunología Veterinaria. México, Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V.

29. Gutiérrez, O., & Pezo, T. (2014). Factores predictores de la leptospirosis en pacientes atendidos en el puesto de salud I-2 Progreso San Juan Bautista – 2014. [tesis de titulación, Universidad Nacional de Amazonia Peruana]. Repositorio Institucional Digital UNAP. https://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12737/3547/Olenka_Tesis_Titulo_2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y

30. Güven, T., Soyal, A., Kalayci, Y., Önlen, C., & Köksal, F. (2016). Comparison of 16s rRNA-PCR-RFLP, Lipl32-PCR and OmpL1-PCR methods in the diagnosis of Leptospirosis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 58(64). https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658064

31. Huerta, C. (2009). Estudio de caso-control para evaluar factores de riesgo en la presentación de leptospirosis canina en la Clínica de Animales Menores de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. [tesis de grado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. Repositorio de Tesis Digitales. https://hdl.handle.net/20.500.12672/751

32. Intriago, G. (2021). Prevalencia de *Leptospira spp*. En perros callejeros rescatados por organizaciones no gubernamentales en la ciudad de Guayaquil en el año 2020. [tesis de titulación, Universidad Agraria del Ecuador]. Repositorio Digital. https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/Intriago%20%20Glenda.pdf

33. Jaiswal, N., Chandrasekaran, S., & Rukadikar, A. (2019). Usefulness of dark field microscopy (DFM), IGM ELISA and microscopic agglutination test (MAT) for the early diagnosis of acute leptospirosis. Indian Journal of Microbiology Research, 6(2), 166-169. https://doi.org/10.18231/j.ijmr.2019.036

34. LKrishna, S., Joseph, S. & Mini, A. (2012). Evaluation of Dark Field Microscopy, isolation and Microscopic Agglutination Test for the diagnosis of canine Leptospirosis. International Journal of Pharmacy and Biological Sciences, 2(3), 85-89. http://www.ijpbsonline.com/uploads/1/2/1/8/12183777/85-89-evaluation_of_dark_field_microscopy_isolation_-vamshi_krishna.pdf

35. Laguna, V. (2000). Leptospirosis. Modulo Técnico. Oficina General de Epidemiología / Instituto Nacional de Salud. https://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/m%C3%B3dulo%20t%C3%A9cnico%202%20leptospirosis.pdf

36. Levett, P. (2001). Leptospirosis. American Society for Microbiology Journals, 14(2). https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001

37. Levett, P. & Picardeau, M. (2021). International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of Leptospiraceae Minutes of the closed meeting, 10 July 2019, Vancouver, British Columbia, Canada. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 71(8): e005002. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005002

38. Lizer, J., Velineni, S., Weber, A., Krecic, M., & Meeus, P. (2017). Evaluation of 3 Serological Tests for Early Detection of Leptospira-specific Antibodies in Experimentally Infected Dogs. Journal of Veterinary Internal Medicine, 32(1), 201-207. https://doi.org/10.1111/jvim.14865

39. Lujan, E. (2019). Leptospirosis en animales de compañía. Marco jurídico en salud animal y salud pública. [Tesis de grado, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires]. Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto UNICEN. https://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/handle/123456789/2214

40. Luna, A.., Moles, C., Gavaldón R., Nava, G., & Salazar, G. (2008). La Leptospirosis canina y su problemática en México. Revista Salud Animal, 30(1), 1-11. http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v30n1/rsa01108.pdf

41. Martín, P. (2018). Diagnóstico de Leptospirosis canina mediante una técnica de PCR en tiempo real. [tesis doctoral, Universidad Nacional de la Plata]. https://doi.org/10.35537/10915/67994

42. Martínez, I., Alpizar, E., Gavaldón, D., Moles, L., Gutiérrez, M., García, R., Shea, M., & Fernández, A. (2016). Canine Leptospirosis serology in southern Mexico City. Open Journal of Medical Microbiology, 6(4). http://dx.doi.org/10.4236/ojmm.2016.64022

43. Medina, Z., Guerra, M., & Veliz, N. (2010). Estudio serológico de Leptospirosis en caninos de un albergue en el estado de Aragua. Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela., 51(2), 93-97. http://ve.scielo.org/pdf/rfcv/v51n2/art04.pdf

44. Medrano, C., Díaz, C., Dalmau, E. (2011). Diagnóstico de leptospirosis canina por medio de las técnicas Dot-ELISA y MAT en perros. Revista de Medicina Veterinaria, 21. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-93542011000100010

45. Miotto, B., Alves, A., Tozzi, B., Zanolli, L., Moreno, A., Días, R., Heinemann, M., Moreno, A., de Souza, A., Lilenbaum, W. & Kuribayashi, M. (2018). Prospective study of canine leptospirosis in shelter and stray dog populations: Identification of chronic carriers and different Leptospira species infecting dogs. PLOS ONE, 13(7): e0200384. https://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0200384

46. Moldes, S. (2017). Estudio seroepidemiológico de leptospirosis canina en el partido de Lomas de Zamora. [tesis de especialidad, Universidad Nacional de La Plata]. Repositorio Institucional de la UNLP. http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/64764

47. Monroy, A., Vargas, J., Di Filippo, G., & Quimbaya, J. (2020). Leptospirosis en reservorios animales: Una revisión de tema. Revista Lasallista de Investigación, 17(2), 266-279. Repositorio Digital Lasallista. http://hdl.handle.net/10567/3018

48. Moraes, A., Biondo, C., Moreira, C., Oliveira, G., Heinemann, M., da Cunha, K., & Paldês, A. (2020). Occurrence of antibodies against *Leptospira spp.* in shelter dogs. Brazilian Journal of Development, 6(6), 40492-40505. https://doi.org/10.34117/bjdv6n6-548

49. Morillo, E. (2015). Incidencia de Leptospirosis en perros domésticos de la ciudadela los Nevados del cantón Latacunga. [tesis de grado, Universidad Técnica de Cotopaxi]. Repositorio Institucional. http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/3290

50. MSP, Ministerio de Salud Pública. (2021). Gaceta Epidemiológica de Enfermedades Zoonóticas, Leptospirosis SE 1 a 51 Ecuador 2021. https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2022/01/Leptospira-SE-51.pdf

51. Murcia, C., Astudillo, M., & Romero, M. (2020). Prevalencia de leptospirosis en perros de trabajo vacunados y en población humana con riesgo ocupacional. Biomédica Revista del Instituto Nacional de Salud, 40(1), 62-75. https://doi.org/10.7705/biomedica.5009

52. Mythri, B. (2015). "Laboratory Diagnosis of Leptospirosis: A Review. Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences, 4 (50), 8759-8769. http://dx.doi.org/10.14260/jemds/2015/1269

53. Pacheco, G. (2015). Una visión general de la Leptospira. Journal of Agriculture and Animal Sciences, 4(1), 46-63. http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/1369/1/820-2296-1-PB.pdf

54. Pineda, M., López, J., & García, M. (1996). Frecuencia de leptospirosis en perros al test de aglutinación microscópica en Chillán-Chile. Arch Med Vet, 28(1), 59-66.

55. Pinta, D. (2020). Determinación de la prevalencia de leptospirosis en pacientes caninos atendidos en el Hospital Docente Veterinario "César Augusto Guerrero". [tesis de titulación, Universidad Nacional de Loja]. Repositorio Digital https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/23821

56. Piredda, I., Ponti, M., Piras, A., Palmas, B., Pintore, P., Pedditzi, A., & Chisu, V. (2021). New Insights on Leptospira Infections in a Canine Population from North Sardinia, Italy: A Sero-Epidemiological Study. Biology, 10(6), 507. https://doi.org/10.3390/biology10060507

57. Polo, O. (2007). Determinación de la presencia de anticuerpos de *Leptospira interrogans*, en perros no vacunados; por la prueba de Microaglutinación (MAT), en clínicas veterinarias ubicadas en la zona 18 de la capital de Guatemala. [tesis de

grado, Universidad de San Carlos de Guatemala]. Institucional USAC https://core.ac.uk/display/35294227?recSetID=

58. Rodríguez, A., Ferro, B., Varona, M., & Santafé, M. (2004). Evidencia de exposición a Leptospira en perros callejeros de Cali. Biomédica Revista del Instituto Nacional de Salud, 24(3), 291-295. https://doi.org/10.7705/biomedica.v24i3.1275

59. Rollán, M., Irrazabal, M., Scialfa, E., Zurbriggen, G., Graiff, D., Giraudo, F. & Ruiz, S. (2018). Seroprevalencia de *Leptospira spp.* En caninos de la ciudad de Córdoba, Argentina. Revista de Salud Pública, 22(3), 68-76. https://doi.org/10.31052/1853.1180.v22.n3.21003

60. Romero, C. (2014). Prevalencia de Leptospirosis canina en el centro poblado de Nuevo Sullana, 2014. [tesis de grado, Universidad Nacional de Piura]. Repositorio Digital http://repositorio.unp.edu.pe/handle/UNP/902

61. Romero C., & Falconar, A. (2016). *Leptospira spp.* y leptospirosis humana. Salud Uninorte, 32(1), 123-143. http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v32n1/v32n1a11.pdf

62. Romero, M., Astudillo, M., Aguillón, D. & Lucio, I. (2018). Evidencia serológica de leptospirosis canina en la comunidad indígena Kamentsá, Putumayo, Colombia. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 29(2), 625-634. http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i2.14495

63. Romero, M., Sánchez, J., & Hayek, L. (2010). Prevalencia de anticuerpos contra Leptospira en población urbana humana y canina del Departamento del Tolima. Revista de Salud Pública, 12(2), 268-275. https://www.scielosp.org/article/rsap/2010.v12n2/268-275/es/

64. Romero, R., Valido, A., & Álvarez, A. (2016). Necesidades ecológicas y ambientales de las leptospiras para su supervivencia en el ecosistema: conocerlas para evitarlas. Medicentro Electrónica, 20(3), 219-222. http://scielo.sld.cu/pdf/mdc/v20n3/mdc10316.pdf

65. Roqueplo, C., Cabre, O., Davoust, B., & Kodjo, A. (2013). Epidemiological Study of Animal Leptospirosis in New Caledonia. Journal Veterinary Medicine International. https://doi.org/10.1155/2013/826834

66. Saldivia, C., Simón, M., Ortega, C., & Alonso, J. (2009). Factores asociados a la respuesta inmunitaria de caninos frente a la Leptospirosis canina. 14(2), 65-72. Obtenido de Intellectual Repository Production UCLA. https://core.ac.uk/reader/71505208

67. Schneider, M., Leonel, D., Hamrick, P., Caldas, E., Velásquez, R., González, F., Mendigaña, J., Gerger, A., Pereira, M. & Aldighieri, S. (2017). Leptospirosis in Latin America: exploring the first set of regional data. Rev Panam Salud Publica, 41(81). https://iris.paho.org/handle/10665.2/34131

68. Schuler, E., & Marconi, R. T. (2021). The Leptospiral General Secretory Protein D (GspD), a secretin, elicits complement-independent bactericidal antibody against diverse Leptospira species and serovars. Vaccine: X, 7, 100089. https://doi.org/10.1016/j.jvacx.2021.100089

69. Schuller, S., Francey, T., Hartmann, K., Hugonnard, M., Kohn, B., Nally, JE., & Sykes, J. (2015). European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. Journal of Small Animal Practice, 56(3), 159-179. https://doi.org/10.1111/jsap.12328

70. Scialfa, E. (2021). Epidemiología de la leptospirosis canina. [ponencia]. I Congreso de Microbiología Veterinaria, Argentina. http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/122095

71. Sharma, K., & Kalawat, U. (2008). Early diagnosis of leptospirosis by conventional methods: One-year prospective study. Indian Journal of Pathology and Microbiology, 51(2), 209-211. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18603683/

72. Siuce, J., Calle, S., Pinto, C., Pacheco, G. & Salvatierra, G. (2015). Identificación de Serogrupos Patógenos de Leptospira en Canes Domésticos. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 265(4), 664-675. http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i4.11221

73. Siuce, J. (2014). Identificación de Serogrupos Patógenos de *Leptospira spp.* en Canes Domésticos. [tesis de post grado, Universidad Mayor de San Marcos]. Repositorio de Tesis Digital https://hdl.handle.net/20.500.12672/3999

74. Soncini, A., Passaro, D., Landolt, N. & Chiani, Y. (2021) Leptospira. En Lopardo, H., Predari, S. & Vay, C. (eds.). Manual de Microbiología Clínica de la Asociación

Argentina de Microbiología, Capitulo IIg.3. Asociación Argentina de Microbiología. https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/Leptospira.pdf

75. Sosa, A. (2015). Estudio Piloto: Detección de Leptospira en el cantón Portoviejo (Manabí). [tesis de titulación, Universidad San Francisco de Quito]. Repositorio Digital http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/4887

76. Spangler, D., Kish, D., Beigel, B., Morgan, J., Gruszynski, K., Naikare, H., Nahar, V., Coarsey, M. & Verma, A. (2020). Leptospiral shedding and seropositivity in shelter dogs in the Cumberland Gap Region of Southeastern Appalachia. PLOS ONE, 15(1): e0228038. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228038

77. Spiri, A. M., Rodríguez-Campos, S., Matos, J. M., Glaus, T. M., Riond, B., Reusch, C. E., Hofmann-Lehmann, R., & Willi, B. (2017). Clinical, serological and echocardiographic examination of healthy field dogs before and after vaccination with a commercial tetravalent leptospirosis vaccine. BMC veterinary research, 13(1), 138. https://doi.org/10.1186/s12917-017-1056-x

78. Sykes, J., Hartmann, K., Lunn, K., Moore, G., Stoddard, R., & Goldstein, R. (2010). 2010 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention. Journal of Veterinary Internal Medicine, 25(1), 1-13. https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0654.x

79. Torres, M., Hernández, S., Agudelo, P., Arroyave, E., Zavala, J. & Puerto, F. (2016). Revisión actual de la epidemiología de la leptospirosis. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, 54(5), 620-625. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27428344/

80. Troyano, L., Amin, D., Bagnis, G., Vissio, C., Chanique, A. & Martín, V. (2017). Leptospirosis canina: descripcion del primer caso clinico en “El Cerrito” (San Rafael-Mendoza-Argentina). Revista Electrónica de Veterinaria, 18(11), 1-11. https://www.redalyc.org/pdf/636/63653574022.pdf

81. Thrusfield M, Christley, Robert., Brown, Helen., Diggle, Peter, J., French, Nigel., Howe, Keith., Kelly, Louise., O'Connor, Annette., Sargeant, Jan., Wood, Hannah.: (2018). Veterinary Epidemiology, Fourth Edition

82. Uribe, D. (2016). Leptospirosis en Bull terrier. Reporte de caso. Veterinaria y Zootecnia, 10(1), 104-114.

http://vetzootec.ucaldas.edu.co/downloads/v10n1a08.pdf?fbclid=IwAR3OokKVy8EmBauiFOOv9c2eQxxgnVpN8Acw7MRsppU2AgwPIlAcnhKYu4Q

83. Velásquez, J. & Garzón, M. (2020). Seroprevalencia a Leptospira patógenas en caninos domésticos de la ciudad de Portoviejo asociada a las características de los animales reaccionantes al MAT. [tesis de grado, Universidad Técnica de Manabí]. Repositorio UTM. http://repositorio.utm.edu.ec/handle/123456789/1417

84. Vincent, A., Schiettekatte, O., Goarant, C., Nela, VK., Bernet, E., Thibeaux, R., Ismail, N., Mohd Khalid, MKN., Amran, F., Masuzawa, T., Nakao, R., Korba, A., Bourhy, P., Veyrier, FJ., & Picardeau, M. (2019). Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus Leptospira through the prism of genomics. PLOS Negleted Tropical Diseases, 13(5): e0007270. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270

85. Wilson, S., Stirling, C., Thomas, A., King, V., Plevová, E., Chromá, L., Siedek, E., Illambas, J., Salt, J., & Sture, G. (2013). Duration of immunity of a multivalent (DHPPi/L4R) canine vaccine against four Leptospira serovars. Vaccine, 31(31), 3126-3130. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.043

86. Yunga, E. (2018). Prevalencia de Leptospirosis mediante la técnica de ELISA para anticuerpos IgG en estudiantes de la Facultad de Medicina en el año 2017. [tesis de titulación, Universidad Central del Ecuador]. Repositorio Digital. http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/16547

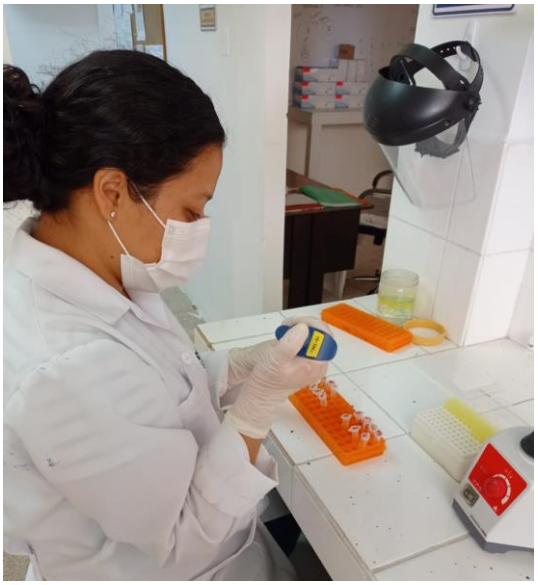
87. Zambrano, P., Lazo, L., Barragán, V., Morales, M., Bulnes, C., Fimia, R. & Iannacone, J. (2017). Estado actual y estrategias futuras en la epidemiología de la leptospirosis en el cantón Portoviejo, provincia de Manabí, Ecuador. Revista Biotempo, 14(2), 197-209. https://doi.org/10.31381/biotempo.v14i2.1321

ANEXOS

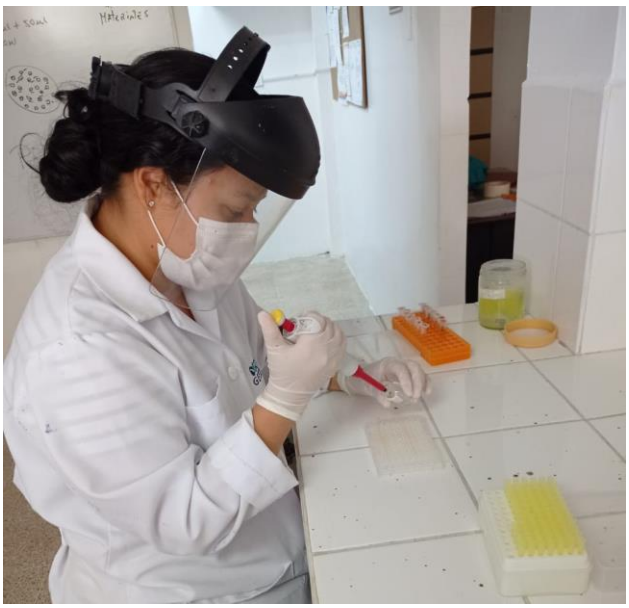
Extracción de muestra sanguínea en vena cefálica

Extracción de muestra de orina por sondaje

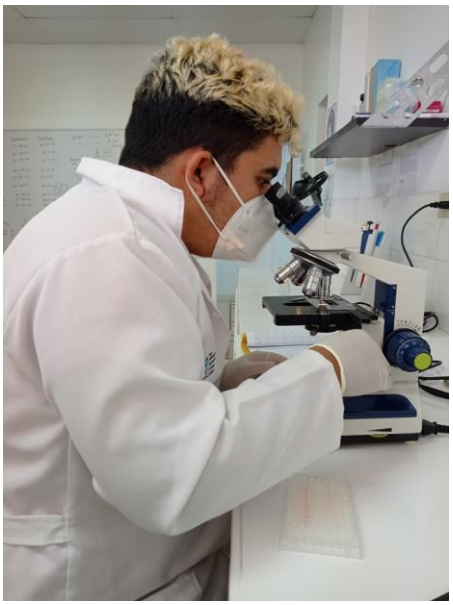
Centrifugación de muestras sanguíneas



Dilución de muestras sanguíneas para screening y titulación



Colocación de antígeno en la microplaca



Observación al microscopio de campo oscuro para evaluación de Aglutinación