



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



TRABAJO DE TITULACIÓN

Previo la obtención del Título de:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

MODALIDAD: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TEMA:

**IDENTIFICACIÓN DE LEPTOSPIRA PATÓGENA MEDIANTE EL USO DE PCR
EN BOVINOS DEL CENTRO DE FAENAMIENTO PORTOVIEJO, Y SU
POTENCIAL RIESGO DE INFECCIÓN AL SER HUMANO**

AUTORES:

NATHALY NICOLE MONTALVO VILLAPRADO

ANA BELÉN PALMA MERA

TUTOR:

DR. VÍCTOR ALFONSO MONTES ZAMBRANO

SANTA ANA – MANABI – ECUADOR

2021

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de titulación en primer lugar a Dios por fortalecer mi corazón y ser mi guía en todo momento.

A mis padres, Nelson David Montalvo Cuenca y Diana Marianela Villaprado Rodríguez, por ser mis pilares fundamentales, quienes me han apoyado incondicionalmente en cada una de mis etapas, ejemplos de amor, constancia y superación, sin ustedes nada hubiese sido posible.

A mi hermana, por brindarme su ayuda y consejos para así poder seguir adelante.

Nathaly Nicole Montalvo Villaprado

DEDICATORIA

*Llena de amor y regocijo. Dedico esta tesis a Dios por darme fuerza
y fortaleza para alcanzar mis objetivos.*

*A mis padres Ana Auxiliadora Mera Loor y Carlos Honorio Palma
Mendoza que siempre me apoyaron incondicionalmente, que desde
pequeña me inculcaron el estudio, por haberme forjado para ser la
persona que soy en la actualidad.*

*A mis hermanos por el apoyo que siempre me brindaron en el
transcurso de cada año de mi carrera universitaria.*

*A mis sobrinos Rachel, Christopher, Anahí especialmente a Bruce por
todo su cariño por verme como un ejemplo como su segunda mamá y
motivarme hacer una mejor persona y crecer día con día.*

Ana Belén Palma Mera

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradecemos a Dios por la vida, por guiar nuestros pasos, por fortalecer nuestros corazones e iluminar nuestras mentes, por haber puesto en nuestros caminos a aquellas personas que han sido el soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Expresamos agradecimientos a nuestros padres por ser los principales promotores de nuestros sueños, por nunca dejarnos solas cuando los necesitamos, por ser esa motivación y energía para seguir avanzando y superándonos en cada fracaso y logro, a nuestros hermanos por siempre estar presentes, acompañándonos y por el apoyo moral brindado a lo largo de esta etapa.

Al laboratorio de Diagnóstico Animal y Biología Molecular de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro AGROCALIDAD por la colaboración en esta investigación procesando los PCR utilizados en este estudio, en particular a Euclides De La Torre Medranda, Director de Diagnóstico Animal y a David Jarrín Escudero Responsable del laboratorio de Biología Molecular por su colaboración.

Al proyecto de investigación titulado “Leptospiras patógenas presentes en animales domésticos y silvestres de tres cantones de la provincia de Manabí: características genómicas, dinámica de eliminación y su distribución en el ambiente”, que nos acogió y nos benefició con una beca de investigación concedida por la Universidad Técnica de Manabí, que permitió cubrir parte de los gastos de esta tesis.

Finalmente, nuestro agradecimiento más profundo es para el tutor de nuestra tesis, Dr. Víctor Alfonso Montes Zambrano, PhD., por su apoyo y dedicación que ha brindado a este trabajo, quien nos ha guiado con mucha paciencia y por impartir sus conocimientos, ganándose nuestra admiración y gratitud.

Nathaly Montalvo y Ana Belén Palma

CERTIFICACIÓN

Dr. Víctor Montes Zambrano, Certifica que el trabajo de titulación en la Modalidad Proyecto de Investigación titulada: “IDENTIFICACIÓN DE LEPTOSPIRA PATÓGENA MEDIANTE EL USO DE PCR EN BOVINOS DEL CENTRO DE FAENAMIENTO PORTOVIEJO, Y SU POTENCIAL RIESGO DE INFECCIÓN AL SER HUMANO”, es trabajo original de las Señoritas: Nathaly Nicole Montalvo Villaprado y Ana Belén Palma Mera, el que ha sido realizado bajo mi supervisión.

Dr. Víctor Montes Zambrano PhD
TUTOR DE TITULACIÓN

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

TRABAJO DE TITULACIÓN

MODALIDAD: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TEMA:

IDENTIFICACIÓN DE LEPTOSPIRA PATÓGENA MEDIANTE EL USO DE PCR EN BOVINOS DEL CENTRO DE FAENAMIENTO PORTOVIEJO, Y SU POTENCIAL RIESGO DE INFECCIÓN AL SER HUMANO

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. Daniel Burgos Macías
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dra. Maritza Barrera Valle Ph.D
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dra. Patricia Zambrano Gavilanes
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Nathaly Nicole Montalvo Villaprado y Ana Belén Palma Mera, declaramos que la investigación titulada “IDENTIFICACIÓN DE LEPTOSPIRA PATÓGENA MEDIANTE EL USO DE PCR EN BOVINOS DEL CENTRO DE FAENAMIENTO PORTOVIEJO, Y SU POTENCIAL RIESGO INFECCIÓN AL SER HUMANO” es un trabajo original de nuestra autoría.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	II
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTO	IV
CERTIFICACIÓN.....	V
Dra. Patricia Zambrano Gavilanes	VI
DECLARACIÓN DE AUTORÍA.....	VII
RESUMEN.....	1
SUMMARY	2
II. ANTECEDENTES.....	4
III. JUSTIFICACIÓN.....	6
IV. HIPÓTESIS.....	7
V. OBJETIVOS.....	8
5.1. Objetivo General:	8
5.2. Objetivos Específicos:	8
VI. MARCO TEÓRICO	9
6.1. Generalidades de la Leptospirosis.....	9
6.2. Descripción de la bacteria Leptospira.....	9
6.3. Estructura celular	9
6.3.1. LipL32	10
6.4. Clasificación.....	10
6.5. Epidemiología	11
6.5.1. Triada epidemiológica.....	11
6.5.2. Reservorio	12
6.5.3. Tipos de hospedador.....	13
6.5.4. Transmisión	14
6.5.6. Fuentes de infección	14
6.5.7. Factores asociados a la infección	14
6.6. Patogenia.....	15
6.6.1. Signos clínicos en bovino.....	16

6.6.2. Cuadros clínicos.....	17
6.7. Diagnóstico.....	17
6.7.1. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	18
6.7.1.1. Ventajas de la prueba diagnóstica PCR.....	19
6.8.2. Estudios epidemiológicos mediante el uso del PCR convencional y en tiempo real.	20
6.8.3. Sensibilidad y especificidad del PCR	20
6.9. Medidas de control	21
VII. DISEÑO METODOLÓGICO	22
7.1. Ubicación.....	22
7.2. Tipo de estudio.....	22
7.3. Cálculo del tamaño muestral	22
7.3.1. Recolección y procesamiento de muestras de orina en el laboratorio de <i>Leptospira</i>	22
7.3.2. Concentración de la muestra de orina	23
7.4. Método de agrupamiento de las muestras de orina	23
7.5. Técnica diagnóstica	24
7.5.1. Extracción de ADN.....	24
7.5.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	25
7.5.3. Electroforesis	26
7.6. Procesamiento de las muestras	26
7.7. Análisis estadístico.....	26
7.7.1. Punto de corte para definir día de riesgo.....	27
VIII. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN	28
XI. RECOMENDACIONES.....	35
XII. PRESUPUESTO.....	36
XIII. CRONOGRAMA	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Muestras de orina recolectadas por mes del CFMP	23
Tabla 2 Concentración de reactivos del master mix	25
Tabla 3 Procedencia de las muestras agrupadas del CFMP	28
Tabla 4 Muestras positivas a PCR convencional seguido del día de observación	28

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1.- Triada epidemiológica de la enfermedad Leptospirosis.	12
Esquema 2.- Selección de las muestras para el análisis mediante PCR.....	24

RESUMEN

La Leptospirosis es una enfermedad infectocontagiosa de distribución mundial, provocada por la bacteria del género *Leptospira*; los climas tropicales, subtropicales y húmedos favorecen a su presentación y proliferación, esta enfermedad afecta tanto a animales domésticos como salvajes e incluso puede afectar al hombre por ser una zoonosis, lo cual ocasiona un gran impacto en la salud pública. El propósito del presente trabajo investigativo, fue identificar la presencia eliminadores de leptospira patógena mediante el uso de PCR convencional en orina de bovinos del Centro de Faenamiento Municipal Portoviejo (CFMP), y poder establecer el potencial riesgo de infección hacia el ser humano que se encuentran en contacto con estos animales infectados; se recolectaron 376 muestras de orina de bovinos de la línea de sacrificio; las cuales fueron recolectadas por un lapso de 40 días, mediante cistocentesis, un aproximado de 10 muestras diarias fueron agrupadas en el laboratorio aplicando el método de agrupamiento (pooled sample) para disminuir el número de muestras a ser procesadas quedando en 2 muestras agrupadas (cada una con 5 muestra) por día, haciendo un total de 75 muestras a las cuales se les realizó PCR convencional utilizando cebador hap1 que amplifica el gen *lipL32* principal proteína de membrana externa de especies de leptospira patógena, los resultados obtenidos lograron detectar un 5,3% (4/75) de ADN leptospiral de las muestras agrupadas por día y un 10% (4/40) de días de riesgo de infección hacia el personal que labora por encontrar la presencia de ADN de leptospira patógena en el estudio; se obtuvo una HSe y HSp de 70% y 35% respectivamente, para los días positivos y negativos, siendo los días 7, 11, 15 y 20 los que presentaron riesgo de infectar al personal que realiza las tareas de faena, debido a la presencia de ADN de leptospira patógena, razón por la que se hace necesario mantener el uso constante de los equipos de protección personal en el personal que labora en el CFMP.

Palabras claves: Extracción de ADN, PCR convencional, pooled samples, leptospira patógena.

SUMMARY

Leptospirosis is an infectious-contagious disease of worldwide distribution, caused by bacteria of the genus *Leptospira*; tropical, subtropical, and humid climates favor its presentation and proliferation, this disease affects both domestic and wild animals and can even affect humans because it is a zoonosis, which causes a great impact on public health. The purpose of this research was to identify the presence of pathogenic leptospira using conventional PCR in bovine urine from the Portoviejo Municipal Slaughterhouse (CFMP), and to establish the potential risk of infection to humans who are in contact with these infected animals; 376 urine samples were collected from bovines from the slaughter line at the Portoviejo slaughterhouse; 10±1 daily samples were collected for a period of 40 days, for the processing of the samples in the laboratory, the samples were grouped 5 samples per day, obtaining 2 grouped daily samples obtaining a total of 75 samples to which a conventional PCR was performed using primer hap 1 that amplifies the gene *lipL32* main outer membrane protein of pathogenic leptospira species, The study was able to detect 5.3% (4/75) at individual level and 10% (4/40) of days of positivity to the presence of pathogenic leptospira DNA in the study; HSe and HSp were obtained of 70% y 35% respectively, for positive and negative days, being days 7, 12, 15 and 20 those that presented a risk of infecting the people who perform the tasks, due to the presence of pathogenic leptospira DNA, which is why it is necessary to maintain the constant use of personal protective equipment in the personnel working in the CFMP slaughtering task.

Keywords: DNA extraction, conventional PCR, pooled samples, pathogenic leptospira.

I. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de gran impacto en la salud pública, es causada por bacterias del género *Leptospira*, que afectan al hombre y a casi todas las especies de mamíferos, tanto silvestres como domésticos, siendo los roedores los principales reservorios (Sedano y Col. 2016). Esta enfermedad está asociada a las actividades ocupacionales relacionadas con la agricultura y animales de producción (cultivos, ganadería lechera, producción porcina y mataderos) así como también al riesgo por contacto con roedores (Alder y Moctezuma 2010).

Las especies patógenas de leptospira son capaces de sobrevivir como bacterias de vida libre durante largos periodos de tiempo después del desprendimiento urinario. Latifah y Col (2017) mencionan que la patogenicidad de la leptospira está influenciada por una proteína de superficie externa de la membrana que juega un papel en la interacción entre la bacteria y el tejido del huésped.

Esfuerzos por controlar esta enfermedad ha llevado al desarrollo de vacunas con células enteras inactivadas, las cuales se han utilizado durante muchos años en animales y humanos. Sin embargo, las vacunas disponibles actualmente no son efectivas para prevenir enfermedades o infecciones en el ganado, debido a que solo producen inmunidad a corto plazo (Haake y Col. 2000).

Estudios realizados en diversas partes del mundo indican que la distribución de la leptospirosis bovina es universal, y el impacto se aprecia con mayor frecuencia en áreas tropicales y subtropicales donde se presenta la enfermedad durante todo el año (Luna y Col. 2005).

El diagnóstico de leptospirosis se basa principalmente en la identificación del agente mediante métodos microbiológicos, moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), y serológicos como la Técnica de Aglutinación Microscópica (Revelo, 2016).

En Ecuador esta enfermedad tiene un carácter endémico siendo la provincia de Manabí la que mayor número de casos de leptospirosis humana son reporta por el Ministerio de Salud Publica durante los últimos años.

II. ANTECEDENTES

En Irán, Shafighi y Col. (2014) en un estudio en el matadero Rasht de Irán de un total de 98 muestras de orina recogidas al azar directamente de la vejiga utilizando jeringas desechables estériles se encontró la presencia de ADN de leptospiras mediante amplificación por PCR del gen rrs (16S rARN) identificando en 42 de las 98 muestras.

Matamala (2018) en un estudio realizado en Chile, donde se muestrearon 11 bovinos para determinar el estatus de infección en vacas lecheras mediante la prueba diagnóstica de PCR en orina, detectó 1 animal positivo (9%), confirmando el hecho de que la bacteria había migrado hacia los tejidos como el riñón y era evidenciado por la presencia de la bacteria en la orina.

En el Ecuador Román y Col. (2016) en su estudio encontró el 22,2% de leptospira patógena en ganaderías lecheras del cantón Loja a través de PCR, identificando a esta enfermedad como la responsable de ocasionar problemas de salud de los animales afectando la eficiencia reproductiva de los animales infectados, así como convertirse en una fuente de contaminación para otros animales susceptibles y para las personas que están en contacto con estos animales en las tareas productivas.

Revelo (2016) analizó 72 muestras (n=72) de orina de bovinos utilizando dos métodos de extracción de ADN: Purelink® Genomic DNA y Chelex-100. El ADN extraído sirvió para la estandarización de 3 protocolos de PCR (rrl, hap 1, rrs), el primer hap 1 utilizado para amplificar el gen que codifica para la proteína LipL32 (especie patógena), primer rrl que codifica para la unidad ribosomal 23S distinguiendo a especies saprofitas, primer rrs el cual codifica para la unidad ribosomal 16 S identificando al género *Leptospira*. En este estudio se identificaron 10 excretores renales (n=10) procedentes de ganaderías de Chone y Pedernales mediante la amplificación del gen rrs, 8 (n=8) amplificaron para el gen lipL32 y ninguna amplificó para el gen rrl.

Sosa (2015) realizó un estudio en la provincia de Manabí donde detectó el 17,8% de positividad a PCR convencional a partir de muestras de orina bovinas y porcinas recolectadas de los mataderos de las parroquias Calderón y Riochico pertenecientes al cantón Portoviejo, de la misma manera estas muestras positivas fueron sometidas a

secuenciación resultando en la identificación de especies de leptospiros compatibles con *L. borgpetersenii*, *L. Wolffii* y *L. interrogans*.

Con estos antecedentes se hace necesario identificar la presencia de animales infectados a leptospira patógena en el centro de faenamiento del cantón Portoviejo a través de PCR e identificar el riesgo al que se encuentran sometido el personal que labora en este centro si no se toman las medidas de protección adecuada.

III. JUSTIFICACIÓN

La leptospirosis es causada por una bacteria del género *Leptospira*, esta bacteria es frecuente en climas tropicales por encontrar un ambiente propicio para su desarrollo y transmisión, esta enfermedad es conocida alrededor del mundo como una zoonosis y es catalogada como una enfermedad endémica en Ecuador, con una alta frecuencia de presentación de casos positivos en humanos. Datos oficiales del Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación del Ecuador, indican que la mayoría de los casos de leptospirosis en la provincia de Manabí se concentran en el cantón Portoviejo. Por esta razón, esta zona es un lugar ideal para estudiar la fuente y posible diseminación de la enfermedad a las personas.

El presente trabajo se enfoca en identificar la presencia de leptospira patógena en orina de bovinos sacrificados, en el centro de faenamiento de Portoviejo, con la finalidad de detectar el nivel de exposición que se encuentra el personal que labora en este centro, al estar en contacto con animales positivos, puesto que esta enfermedad repercute negativamente en la población de la provincia de Manabí lo que se ve reflejado en las estadísticas del MSP que ubican a esta provincia como la primera en casos clínicos detectados en humanos.

La prueba diagnóstica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha resultado ser muy útil, presentando varias ventajas sobre las técnicas de detección serológicas, como son: mayor sensibilidad y rapidez en la obtención de resultados, permite identificar el real estatus del animal, lo que sirve de gran ayuda si deseamos identificar el grado de exposición y el riesgo al que se encuentran sometidos el personal que labora en el centro de faenamiento. Con la presente investigación se pretende conocer los días de mayor riesgo del personal que labora en el centro de faenamiento, y poder alertar a los administradores de este centro para que implementen las medidas de protección al personal que se encuentra expuesto a animales infectado, sirviendo de aporte para la prevención de esta enfermedad con mayor impacto en el cantón y la provincia de Manabí.

IV. HIPÓTESIS

Existe una alta frecuencia de bovinos eliminadores de leptospira patógena por orina en el Centro de Faenamiento Municipal Portoviejo lo que ocasiona un mayor riesgo para las personas que entran en contacto con la canal y despojos de los animales sacrificados

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General:

Identificar eliminadores de leptospira patógena mediante el uso de PCR en bovinos del Centro De Faenamiento Portoviejo, estableciendo el potencial riesgo de infección al ser humano.

5.2. Objetivos Específicos:

- Detectar la presencia de eliminadores de leptospira patógena en muestras de orina bovina mediante la técnica de PCR.
- Identificar los días de mayor riesgo de infección al personal del Centro de Faenamiento Municipal Portoviejo en las tareas de sacrificio, a través del cálculo de estimadores Hse y Hsp.

VI. MARCO TEÓRICO

6.1. Generalidades de la Leptospirosis

De acuerdo a Tamara y Col. (2018), la leptospirosis es una enfermedad infectocontagiosa, aguda y febril que afecta sobre todo a los animales salvajes y domésticos que sirven como fuente de infección para el hombre. Arias y Col. (2011) argumentan que la leptospirosis es endémica en muchos países, sobre todo en áreas templadas o tropicales, tiene una distribución estacional incrementándose con el aumento de las lluvias y temperatura, sin embargo, la enfermedad puede ocurrir a lo largo de todo el año. La rata como otros roedores son considerados como los principales reservorios.

La supervivencia de la bacteria en el medio depende de las condiciones del suelo y el agua, es susceptible a la desecación y a los cambios de pH que se alejan de la neutralidad; la humedad favorece la persistencia del microorganismo, pudiendo permanecer hasta 183 días en suelos con agua; sin embargo, cuando el suelo se seca por el efecto del viento esta puede sobrevivir por 30 minutos (González, 2018).

Según César (2003) la principal fuente de infección con leptospira patógena, es mediante el contacto con animales enfermos eliminadores de la bacteria por orina.

6.2. Descripción de la bacteria Leptospira

Según Francois y Col. (2013) la leptospira pertenece a la familia Leptospiraceae, segunda familia del orden Spirochaetales. Son bacterias aeróbicas o microaerofílicas de forma espiral estrechamente enrolladas, flexibles y delgadas; mide de 6-20 μm de longitud y 0,1 a 0,3 μm de diámetro; además son capaces de metabolizar el oxígeno, presentando temperaturas óptimas de crecimiento de 28-30 $^{\circ}\text{C}$ y un pH que oscila de 7,2 – 7,6 (Nieves, 2021).

6.3. Estructura celular

Según García y Col. (2013) está constituida por un cuerpo citoplasmático y un axostilo, el cual se dispone en forma de espiral, con una membrana envolvente recubriendo dichas

estructuras. Nieve (2020) explica que entre la membrana externa e interna se encuentra una pared de peptidoglicanos, cuyo componente junto a otras proteínas del citoesqueleto es la responsable de la forma espiralada de la bacteria.

En la membrana externa; se han identificado 3 tipos de proteínas entre ellas tenemos: proteínas transmembranales, lipoproteínas y proteínas periféricas de membrana, las proteínas de membrana externa actúan funcionalmente como barreras de difusión, además de estar involucradas en el proceso de formación de tabiques y absorción de nutrientes para el crecimiento (Revelo, 2016).

6.3.1. LipL32

Latifah y Col. (2017) mencionan que la lipoproteína LipL32 está presente en la membrana externa de la leptospira patógena, y se encuentra de forma abundante en la superficie; esta proteína se expresa en altos niveles durante el proceso infeccioso en mamíferos, además de tener una elevada capacidad inmunogénica. Chávez (2012) indica que LipL32 contiene 272 aminoácidos con 38.000 copias por célula, su secuencia y expresión es muy conservada entre las especies patógenas; por lo tanto, es un antígeno importante en la patogénesis, diagnóstico y prevención de la leptospirosis. Según Haake (2002), tiene una masa molecular de aproximadamente 20 kDa y su movilidad electroforética es de 32 kDa; sin embargo, Lee (2000) explica que la lipoproteína LipL32 se considera que promueve la hemólisis mediada por esfingomielinasa SphH, por esta razón, esta lipoproteína también se conoce como Proteína asociada con hemólisis Hap-1 (Hemolysis associated protein 1).

6.4. Clasificación

Según, Retamal y Abalos (2019), la clasificación genotípica incluye varias genomoespecies tanto leptospiros patógenas como saprofitas; Bennett y Col. (2021) indican que en la actualidad se clasifican por diversas especies definidas por el grado de proximidad genética determinado mediante la reabsorción del ADN.

Brihuega (2008) menciona que el Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos de Norteamérica definió la presencia de 16 genomoespecies, Levett (2014) anunció la presencia de 23 especies; no obstante, Thibeaux y Col. (2018) en un estudio asilaron 12

especies nuevas, aumentando consigo a 35 especies de leptospira, distribuidas de la siguiente manera:

- **Especies patógenas:** *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. interrogans*, *L. adleri*, *L. ellisii*, *L. barantonii*, *L. kmetyi*, *L. alstonii*, *L. weilii*, *L. santarosai*, *L. borgpetersenii*, *L. mayottensis*, *L. alexanderi*.
- **Especies Intermedias:** *L. fainei*, *L. inadai*, *L. broomii*, *L. perolatti*, *L. wolffii*, *L. venezuelensis*, *L. licerasiae*, *L. neocaledonica*, *L. hartskeerlii*, *L. saintgironisae*, *L. haakeii*
- **Especies Saprófitas:** *L. idonii*, *L. wolbachii*, *L. macculloughii*, *L. brenneri*, *L. harrisiae*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae*, *L. meyeri*, *L. yanagawae*, *L. levetti*, *L. Biflexa*.

Posteriormente, Vincent y Col. (2019), revelaron en su investigación que el género *Leptospira* contiene 64 genomoespecies; incluyendo las 35 especies mencionadas anteriormente, 4 especies nuevas de Japón y 25 nuevas especies aisladas. Esto nos indica que la clasificación del género *Leptospira* ha sido muy dinámica a lo largo de los años y cada día aparecen nuevas especies de leptospira identificadas molecularmente.

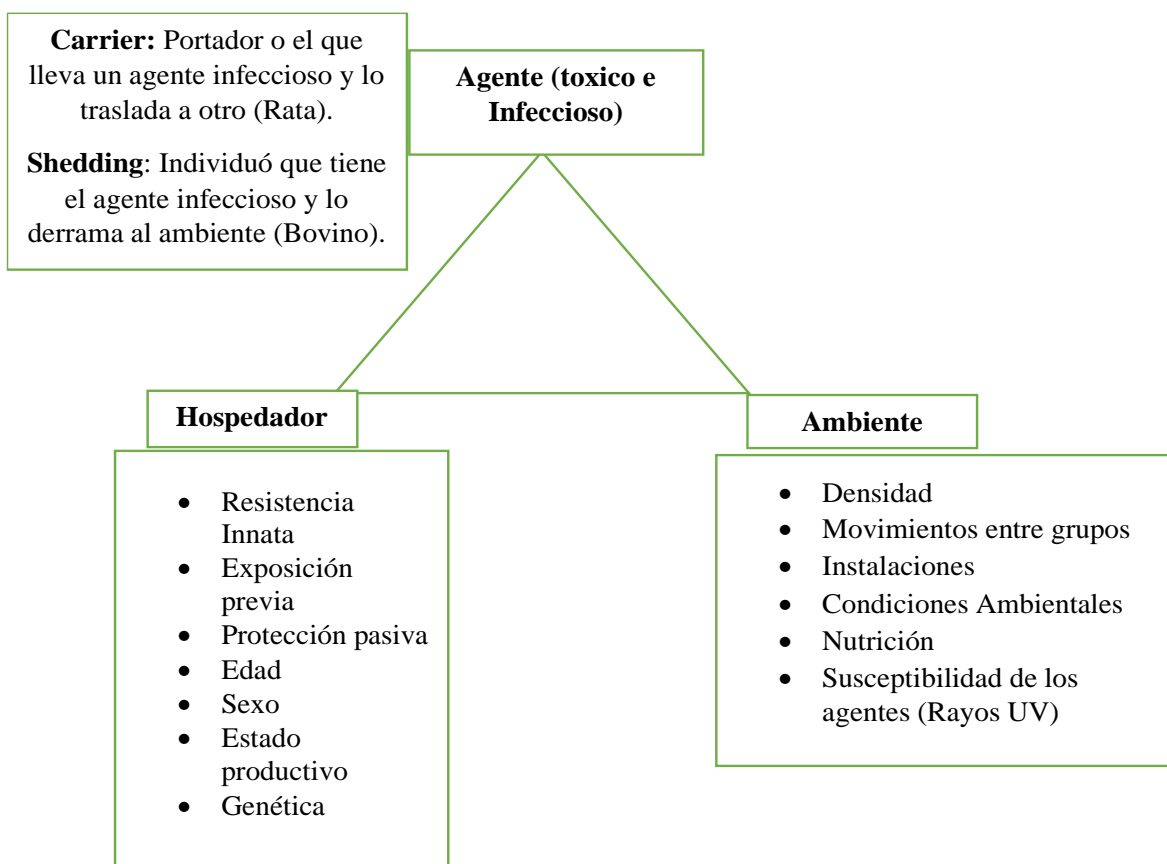
6.5. Epidemiología

El estudio epidemiológico de esta enfermedad es complejo, debido a su distribución mundial y al gran número de factores que influyen en su presentación, dificultando la extrapolación entre las regiones geográficas y obligando al conocimiento de determinantes de cada continente, país, región o zona; sumado a la existencia de varias cepas patógenas las cuales pueden afectar a los mamíferos, donde algunos actúan como hospederos de mantenimiento o accidentales (Castillo, 2014).

6.5.1. Triada epidemiológica

Howlett y Col. (2021) establecieron que la tríada epidemiológica explica cómo la enfermedad es el resultado de interacciones complejas entre cada uno de estos elementos, por ejemplo: la leptospirosis a menudo es causada por un agente, sin embargo, la exposición por sí solo no siempre hace que un animal o persona se enfermen; en el esquema n°1 se observan los elementos de la tríada epidemiológica.

Esquema 1.- Triada epidemiológica de la enfermedad Leptospirosis.



Fuente: Howlett y Col (2021).

6.5.2. Reservorio

Thrusfield, y Col. (2018) indicaron que el reservorio es también conocido como hospedador reservorios que es en donde vive y se multiplica el agente infeccioso, siendo una fuente habitual de infección para otros animales, Odriozola (2001) menciona que la leptospira tiene como reservorio a los animales domésticos y salvajes, siendo estos últimos, específicamente los de vida libre como ratas, comadrejas y reptiles los portadores del agente infeccioso.

Los animales reservorios desarrollan una relación comensal con la leptospira, estos animales son asintomáticos o puede presentar una forma clínica leve, portan el patógeno en sus túbulos renales ya que la bacteria se recluye rápidamente en este sitio eliminando espiroquetas patógenas por la orina y contaminando el medio ambiente (Cagliero y Col, 2018).

6.5.3. Tipos de hospedador

Los hospedadores son aquellos que se infectan y albergan en su interior el agente infeccioso, dentro de la cadena epidemiológica de la leptospirosis intervienen hospedadores de mantenimiento y accidentales; es decir, los hospederos de mantenimiento incluye a las especies animales donde la infección es endémica, esta es transmitida por contacto directo de individuo a individuo; y el hospedador accidental se infecta a través del contacto indirecto por contaminación ambiental con orina de animales infectados. No obstante, los hospederos de mantenimiento de mayor importancia son los pequeños mamíferos silvestres como roedores, los cuales transmiten la enfermedad a animales domésticos, caninos e incluso al hombre (Romero y Col, 2011).

A continuación, Gallo (2003) menciona algunos serovares y el huésped al que afecta:

Serovares	Huésped reservorio	Huésped accidental
Pomona	Bovino, cerdo, Zorrillo, Comadreja	Hombre, perro, gato, oveja, cabra, conejo, ratón, ciervo
Hardjo	Bovino	Bovino, hombre, perro, cerdo, oveja, caballo
Icterohaemorrhagiae	Rata	Rata, hombre, ratón, perro, gato, bovino, caballo, zorro
Canicola	Perro	Hombre, gato, bovino, rata, cerdo, zorrillo, comadreja
Grippotyphosa	Zorrillo, comadreja	Zorrillo, comadreja, Hombre, perro, gato, oveja, cabra, bovino, cerdo, rata

Fuente: Gallo (2003).

6.5.4. Transmisión

Dentro de la transmisión de la enfermedad existe un componente muy crítico que es de gran importancia, el portador renal, que según lo mencionado por González (2018) va eliminando la bacteria a través de la orina de una manera crónica.

Las principales vías de transmisión son: la horizontal y vertical; Castillo (2014) las describe a continuación:

- **Horizontal directa:** por contacto directo con fluidos de los genitales (forma venérea) en animales, y por núcleos goticulares; es decir mediante gotas de orina ya que estas se dispersan varios metros del animal, ocurriendo la transmisión por vía conjuntival o por inhalación.
- **Horizontal indirecta:** esta vía ejerce un papel importante en las infecciones accidentales, debido a que se produce mediante la exposición al ambiente con material contaminado como por ejemplo: alimento, pastos, agua y suelos.
- **Vertical:** transplacentaria cuando la bacteria atraviesa la placenta durante la fase de leptospiremia; como lo establecieron Leal y Col. (2017), Encontraron leptospira en el 71,1% de terneros muestreados durante los primeros días de nacimiento, considerándolos positivos dentro de los primeros 7 días de vida, los demás animales 26,7% presentan una transmisión horizontal que es la que se da durante las primeras semanas de vida.

6.5.6. Fuentes de infección

En el ganado bovino las fuentes de infección más frecuentes son: la orina, la leche, las descargas postparto, el agua y pastos contaminados con materiales procedentes de animales infectados (Andicoberry y Col, 2001).

6.5.7. Factores asociados a la infección

Andicoberry y Col. (2001) mencionan una serie de factores asociados a la infección por leptospira, estos factores dependen del agente etiológico, el hospedador y del medio en el que se encuentra:

- **Factores del agente etiológico:** la leptospira son microorganismos muy sensibles a las condiciones ambientales, por lo tanto, existen determinantes de su supervivencia en el medio ambiente como: temperatura templada, ambiente húmedo, pH neutro o ligeramente alcalino.
- **Factores del hospedador:** la edad y el estado inmunitario.
- **Factores del medio:** el principal factor es el manejo, el cual está en función con la aptitud y alimentación; mencionando que los casos de leptospirosis ocurren con mayor frecuencia en el ganado lechero ya que se explota en sistema intensivos y semi-intensivos lo que lleva a un mayor hacinamiento y favorece a la transmisión de la infección.

6.6. Patogenia

Chavarría y Col. (2015) explican que el ingreso de leptospira patógena en el organismo ocurre a través de las membranas mucosas, por lesiones en la piel o por la ingestión de agua y alimentos contaminados; luego de su entrada, se establece una infección sistémica en donde la interacción con las células del hospedero y la expresión de las moléculas por parte de esta bacteria, son fundamentales para lograr la adhesión y posterior colonización del microorganismo

Ariza y Berdugo (2017), menciona que la causa del mecanismo de patogenicidad es por el sistema inmune, toxinas, adhesinas, lipoproteínas (LipL32) y proteínas superficie. Estas proteínas desempeñan un papel importante en la patogénesis, dado que actúan como adhesinas, puntos de fijación de los anticuerpos, porinas, receptores para proteínas solubles como los sideróforos y proteínas de complemento, e incluso se presume participan en los mecanismos de evasión de la respuesta inmune y, por ende, de la persistencia de las espiroquetas en el hospedador. Rada (2018) argumenta que la proliferación de la bacteria ocurre en órganos parenquimatosos (bazo, hígado, riñón, meninges) principalmente.

La bacteria invade el torrente sanguíneo y comienza a multiplicarse, iniciando la fase de leptospiremia la cual tiene un periodo de 7 días; cuando el número de leptospira en los tejidos alcanza un nivel crítico se hace visible la signología. La lesión primaria ocurre en el

endotelio vascular, lo que conlleva a una isquemia localizada causando daños en los diferentes órganos afectados (Yunes y Col. 2016).

Castillo (2014) menciona que después de la fase de leptospiremia, la bacteria se acantona en el riñón, posteriormente se multiplica en la luz de los túbulos contorneados renales, causando nefritis por el daño capilar, dando lugar a la fase de leptospiruria, cuya fase puede ser de carácter continuo o intermitente y de duración variable según la especie afectada; el bovino puede tener una leptospiruria que persiste por muchos meses.

Según Ariza y Berdugo (2017), los signos clínicos que se pueden observar en los animales infectados son causa de la patogenicidad de la leptospira, como la lipasa y hemolisina. Esta última, es causante de la lisis eritrocitaria que sensibiliza el sistema inmune a los anticuerpos de la superficie destruyéndolos; las toxinas bacterianas producidas por la leptospira pasan la barrera placentaria ocasionando la muerte fetal por hipoxia provocando así aborto, aquellas leptospiras que no se destruyen evaden el sistema inmune y se refugian en riñones, donde se anidan y producen su acción patógena, para posteriormente diseminarse por orina.

Montes y Col. (2017) establecieron patrones de eliminación y carga bacteriana clasificándose en: no persistente, persistente, breve persistente, alto persistente e intermitente; observando en intermitente una carga de 6.1×10^4 equivalente genómico/ml, breve persistente 5.0×10^4 equivalente genómico/ml, y alto persistente 9.3×10^4 equivalente genómico/ml. Leal y Col. (2017) indicaron que la carga bacteriana en terneros que nacen con ADN de leptospira es de 5.1×10^4 GE/ml, mientras que para los terneros que contraen la enfermedad durante los primeros meses de vida es de 2.16×10^4 GE / ml.

6.6.1. Signos clínicos en bovino

Según González (2018) esta enfermedad se caracteriza por septicemia, fiebre alta, anorexia, congestión pulmonar, petequias en mucosas, depresión y anemia hemolítica con hemoglobinuria, ictericia y palidez de las mucosas; ocasionalmente meningitis, en la cual el animal muestra incoordinación, sialorrea, conjuntivitis y rigidez muscular.

SAG (2015) mencionó que los signos clínicos dependen de la edad del animal afectado y varían de la siguiente manera:

- **Terneros:** presentan pirexia, anorexia, conjuntivitis y diarrea, cuando el caso de la enfermedad es más severo se manifiesta ictericia, hemoglobinuria, neumonía, incluso signos de meningitis como hiper-salivación, incoordinación de movimientos y finalmente rigidez muscular; la muerte puede suceder dentro de 3 a 5 días.
- **Adultos:** disminución de la fertilidad y producción láctea, infertilidad, abortos, retención de placenta, la ictericia se manifiesta en animales severamente afectados.

6.6.2. Cuadros clínicos

En el ganado bovino la enfermedad cursa con diferentes cuadros clínicos desde agudos, hiper-agudos con fiebre, hematuria, hemoglobinuria, meningitis; crónicos e incluso mortalidad. En los animales adultos, las lesiones se localizan principalmente en los riñones, siendo este uno de los órganos más afectados (González y Rivera, 2015).

González (2018) alega que la leptospirosis bovina se presenta de 3 formas:

- **Forma aguda:** se produce un cuadro de septicemia con pirexia (40,5 - 41,5°C), hemólisis intravascular extensa, hemorragias petequiales en la mucosa, daño vascular en el riñón, anemia y nefrosis hemoglobinúrica, en esta fase el animal afectado puede morir por la septicemia y la anemia hemolítica.
- **Forma subaguda:** no se manifiestan signos clínicos (fase asintomática).
- **Forma crónica:** después de la invasión generalizada, se produce el aborto por la muerte del feto esto ocurre en el último tercio de la gestación, además se puede presentar degeneración placentaria.

6.7. Diagnóstico

Esta enfermedad es la causa principal de pérdidas económicas a la industria ganadera. Los métodos indirectos buscan la presencia de anticuerpos específicos circulantes en la sangre del individuo, mientras que los métodos directos detectan la bacteria o su ADN en tejidos o fluidos del individuo que ha sido infectado; entre estas técnicas tenemos la Reacción en la

Cadena de la Polimerasa (PCR), cultivo, inmunofluorescencia, entre otros (Matamala, 2018).

6.7.1. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa fue creada hace 35 años aproximadamente, en 1986 dicha técnica fue mejorada por el doctor Kary Banks Mullis a partir de las técnicas de amplificación descritas por los doctores Klepe y Gobing en años anteriores. En 1993 debido a todas mejoras realizadas en la técnica Kary Banks Mullis gana el premio Nobel de Química, convirtiéndose en una de las técnicas más importantes de la biología molecular (Ferrari,2020).

Es una técnica diagnóstica directa que se ha utilizado cada vez más para el diagnóstico de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos de crecimiento lento como leptospira y puede usarse como una herramienta para el diagnóstico rápido, así como para estudios epidemiológicos a gran escala (Gibello y Col. 2001).

Según Ospina y Hernández (2015) el querer tener un diagnóstico directo y rápido ha permitido desarrollar numerosos ensayos de PCR, permitiendo un diagnóstico definitivo desde la fase aguda hasta la convalecencia de la enfermedad; estos ensayos consisten en la identificación de genes presentes en leptospira como lo es rrs, secY, lipL32, entre otros, esto se realiza a partir de la amplificación de cantidades de ADN las cuales sirven como marcadores moleculares de la infección.

Esta prueba diagnóstica permite obtener un gran número de copias de una secuencia determinada a partir de un segmento específico de ADN. Todas las variaciones de la técnica comparten el mismo fundamento; en el PCR convencional la detección de los fragmentos amplificados se lleva a cabo por electroforesis en gel de agarosa y tinción al final del proceso de amplificación. La técnica de PCR se caracteriza por ser un método diagnóstico altamente sensible y específico (Martin y Col. 2015).

Según Gibello y Col. (2001), la PCR se ha utilizado para detectar leptospira en muestras de orina de bovinos infectados de forma natural utilizando cebadores específicos del género

Leptospira. Las ventajas de la PCR sobre otros métodos de diagnóstico genético radican en su simplicidad y rapidez, así como en su especificidad y sensibilidad.

Cebadores

Revelo (2016) explica que existen cebadores específicos que se han desarrollado a partir de genes definidos, los cuales sirven para identificar secuencias conservadas como el gen *rrs* que codifica para la unidad ribosomal 16S con un producto de 240 pares de bases (pb) presentes en género *Leptospira*, el gen *rriI* codifica la unidad ribosomal 23S con un producto de 482 pb identificando especies saprofitas, y *hap1* que detecta genes que codifican para proteínas como LipL32 presente en las especies patógenas, cuyo producto es de 262 pb.

Hap 1

La proteína asociada a hemólisis también denominada Hap1 fue identificada por Lee y Col. (2000) como una proteína expresada solamente en las leptospira patógena; la utilización del gen *hap1* como cebador permite identificar las diferentes genomoespecies que tienen presente dicho gen. Baquero y Col. (2010) mencionan que *hap1* promueve la hemólisis mediada por esfingomielinasa (SphH).

Según Romero (2016) la SphH es una hemolisina que tiene una función de lisis celular de eritrocitos y además contribuye al daño del endotelio de pequeños vasos; además, Lee y Col. (2000) indican que la hemólisis es causada por la formación de poros en las membranas de las células diana.

6.7.1.1. Ventajas de la prueba diagnóstica PCR

Haneke y Barrabes (2017) mencionan las ventajas del diagnóstico por PCR:

- Tiene una elevada sensibilidad, facilitando su aplicación y estandarización en el laboratorio.
- Los resultados de la PCR se obtienen en pocas horas, en contraposición a los métodos de cultivo, que puede tardar varios días hasta arrojar resultados.
- Permite conocer el estado actual de infección de un rebaño, permitiendo incorporar medidas de control.

6.8.2. Estudios epidemiológicos mediante el uso del PCR convencional y en tiempo real

En Irán, Shafighi y Col. (2014) realizaron un estudio en el matadero Rasht de Irán, utilizando 98 muestras de orina recogidas al azar directamente de la vejiga con jeringas desechables estériles; analizaron la presencia de ADN de leptospiras mediante amplificación por PCR del gen rrs (16S rARN) identificando en 42 (43%) de las muestras ADN de leptospira.

PCR en tiempo real (qPCR)

En Sudamérica, Matamala (2018) evaluó la presencia de leptospira patógena, tomando muestras de orina de 11 vacas lecheras de 5 rebaños diferentes, las cuales presentaron aborto; las muestras fueron tomadas no más de 7 días después del evento, los animales que abortaron debieran presentar más de 3 partos al momento del muestreo. La recolección de la orina se llevó a cabo por estimulación directa en la zona vulvar con tubos de centrifugación estériles; estas muestras fueron analizadas con el sistema de PCR en tiempo real, teniendo como blanco al gen lipL32, del total de las muestras procesadas solo 1 fue positiva (9%), mencionando que en 2 bovinos no se pudo obtener muestra de orina.

En Ecuador Román y Col. (2016) obtuvieron 19 (21%) muestras de orina positivas a PCR en tiempo real (qPCR) para leptospira, las 19 muestras positivas a qPCR se re amplificaron con PCR convencional logrando amplificar en 11 de ellas la bacteria, este estudio fue realizado a partir de 90 muestras de orina bovina proceden de animales vivos y faenados en ganaderías lecheras del cantón Loja.

Loor y Muñoz (2020) obtuvieron el 17,4% (53 cerdos) de positividad a leptospira, por PCR en tiempo real sobre el gen lipL32, a partir de muestra de riñón, el cual fue realizado en un estudio por conveniencia en el centro de faenamamiento de Rocafuerte donde recolectaron 303 muestras.

6.8.3. Sensibilidad y especificidad del PCR

Según Hernández y Col (2011) la PCR en muestras de orina bovina tiene un 100% de sensibilidad y un 99% de especificidad en comparación con cultivos microbiológicos, estos resultados concuerdan con los mencionados por Martín y Col (2015), indicando que la PCR

es una técnica confiable y eficaz para el diagnóstico de leptospira en muestras de orina bovina.

6.9. Medidas de control

González y Rivera (2015) mencionan que el control de la leptospirosis consiste principalmente en la prevención, vacunación y tratamiento; sin embargo, Andicoberry y Col. (2001) explican que la profilaxis higiénico-sanitario junto con la vacunación y el tratamiento son muy esenciales ya que ninguna de estas medidas son eficaces por separado; la profilaxis higiénico-sanitario se basa en el control de hospedadores de mantenimiento silvestres y en hospedadores domésticos.

Según Ariza y Berdugo (2017) la inmunización de los animales utilizando vacunas efectivas para gran variedad de serotipos de leptospira confieren una mayor protección contra la infección; además, es recomendable que los futuros vientres estén inmunizados contra enfermedades reproductivas, dicha inmunización debe iniciar a los 4-5 meses con vacuna y refuerzo; el uso de antibióticos es aconsejable en animales expuestos como medida profiláctica con el fin de prevenir la enfermedad.

VII. DISEÑO METODOLÓGICO

7.1. Ubicación

La investigación se llevó a cabo en el Centro de Faenamiento Municipal del cantón Portoviejo (CFMP), el cual se encuentra ubicado en la provincia de Manabí, con una latitud de 1.0546° S y una longitud de 80.4545° O, Google Maps (2017).

7.2. Tipo de estudio

El presente trabajo fue un estudio de tipo transversal a partir de muestras de orinas recolectadas durante los meses de Diciembre 2019 a Febrero 2020 de los animales que se sacrificaron en el Centro de Faenamiento Municipal Portoviejo y que se encontraban almacenadas como banco de muestra en el Laboratorio de Leptospira de la Facultad de Ciencias Veterinarias.

7.3. Cálculo del tamaño muestral

Este se realizó asumiendo una prevalencia del 32%, un error del 5% y un nivel de confianza del 95%, utilizando la fórmula de proporciones para población desconocida establecida por Thrusfield y Col (2018).

7.3.1. Recolección y procesamiento de muestras de orina en el laboratorio de Leptospira

Un total de 376 muestras fueron recolectadas por conveniencia durante 40 días, a partir de los 10 primeros animales que ingresaron a la línea de sacrificio del CFMP por día, donde una vez sacrificados y durante la etapa de evisceración se procedió a la extracción de 3 ml de orina por cistocentesis con la ayuda de una jeringa estéril, para posteriormente ser llevadas al laboratorio de leptospira y posterior procesamiento. El detalle de las muestras recolectadas durante los 40 días se describe en la tabla 1.

Tabla 1 Muestras de orina recolectadas por mes del CFMP

Mes	Días	Media muestras día	Muestras	Muestras individuales	Porcentaje
Diciembre	4	10,0	8	40	10,67%
Enero	20	9,8	37	196	49,33%
Febrero	16	8,6	30	140	40,00%
Total	40	9,5	75	376	100,00%

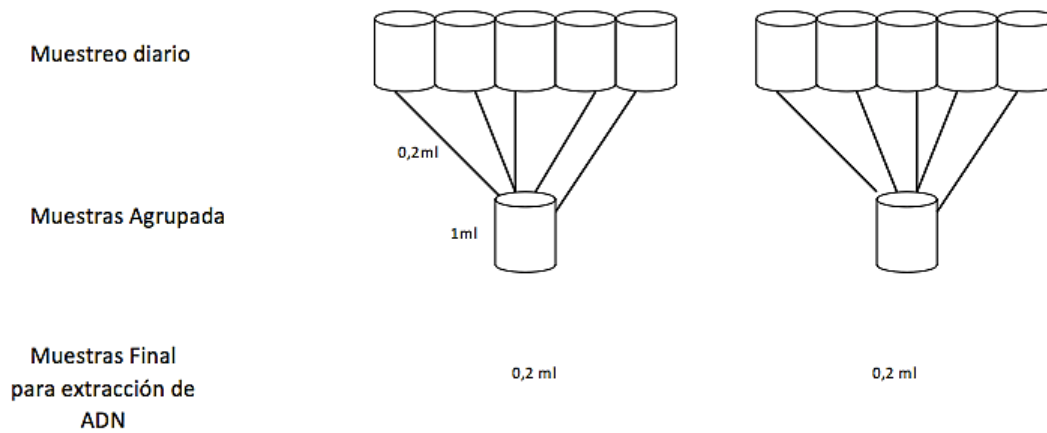
7.3.2. Concentración de la muestra de orina

Las muestras de orina recolectadas fueron trasvasadas 1 ml en tubos eppendorf y sometida a un tratamiento previo de concentración bacteriana adaptado para leptospira siguiendo el protocolo establecido por Stoddard 2013. Las muestras recolectadas fueron centrifugadas x 15 minutos a 3.000 g, eliminado el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 1 ml con Tampón Fosfato Salino (PBS), este procedimiento fue repetido por dos ocasiones y posteriormente fue conservadas y almacenado a -20°C.

7.4. Método de agrupamiento de las muestras de orina en el laboratorio

Las muestras fueron agrupadas en lotes de cinco muestras, tal como se detalla en el esquema N° 2, donde se obtuvo 200 µl de cada muestra individual tratada con PBS colocada en un tubo eppendorf obteniendo dos muestras agrupadas por día. Un total de 75 muestras agrupadas fueron resultantes del proceso, permitiendo de esta manera disminuir el número de muestras a ser procesadas y por ende los costos que incurre analizar un número mayor de muestras por la técnica de PCR (Christensen y Gardner 2000).

Esquema 2.- Selección de las muestras para el análisis mediante PCR.



Elaborado: Autoras de tesis.

7.5. Técnica diagnóstica

Para la realización de la técnica diagnóstica se debió realizar primeramente la extracción de ADN a partir del siguiente protocolo:

7.5.1. Extracción de ADN

A partir de las muestras agrupadas y previamente homogeneizadas, se extrajo 200 μ l de muestra el cual era colocado en un eppendorf para la extracción del ADN según el protocolo usado por Matamala (2018), donde utilizaba 500 μ l de buffer de lisis el cual estaba integrado por (EDTA, SDS, TRIS, NaCl) y 5 μ l de proteinasa K, el cual era depositado en eppendorf donde contenía los 200 μ l de muestra, para luego ser incubado por una hora a 56 °C con la ayuda de un termobloque, después de este tiempo, se agregó 500 μ l de etanol al 100% se incubó a -20°C por 10 minutos, luego se centrifugó a 16.300g por 7 min y se eliminó el sobrenadante, posteriormente se agregó 200 μ l de etanol al 70% y centrifugando nuevamente a 16.300g por 7 min y se retiró el sobrenadante, luego se dejó secar con la tapa hacia abajo sobre una toalla de papel durante 1 hora, para finalizar con el proceso se agregó 50 μ l de agua de PCR en los tubos eppendorf, se procedió a incubar por 5 min a 80°C en el termobloque y se guardó el ADN a -20°C, hasta su procesamiento.

7.5.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El ADN molde obtenido fue analizado mediante un PCR convencional, donde se utilizó 5 µl del ADN, se empleó el cebador (primers) reportado por Branger (2005), el cual permite identificar a leptospira patógena y se detalla a continuación: hap1 Forward (5'GCAAGCATTACCGCTTGTGG3') - hap1 Reverse (5'TGTTGGGGAAATCATACGAAC3') el cual identifica 262 pares de base (pb). Este protocolo incluyó un control negativo (agua) y un control positivo (ADN de cultivo de leptospira).

La concentración de los reactivos para la preparación del master mix se muestran en la tabla #2

Tabla 2 Concentración de reactivos del master mix

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

Hernández y Col (2011) mencionan el perfil térmico usado para el primer hap 1 consistió en: Incubación a 94 °C durante 5 min, desnaturalización de 44 ciclos de amplificación a 94 °C durante 15 seg, alineamiento a 56 °C durante 35 seg, extensión a 72 °C durante 40 seg y una extensión final a 72 °C durante 5 min.

7.5.3. Electroforesis

Esta fue realizada en un gel de agarosa al 1,5% teñido con Gel Start – Lonsa por aproximadamente 40 minutos a 100 voltios, se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb para la lectura.

7.6. Procesamiento de las muestras

El procesamiento de las muestras y las extracciones de ADN fueron realizadas en el laboratorio de leptospira ubicada en los Laboratorio Agropecuario de la UTM en la parroquia Lodana, cantón Santa Ana y las PCR convencional fueron realizadas en el laboratorio de Diagnóstico Animal y Biología Molecular de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro AGROCALIDAD ubicado en la Provincia de Pichincha, Tumbaco- Quito.

7.7. Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva en el análisis de los resultados de los días en riesgos, además con la finalidad de detectar el riesgo de infección al que se encuentran expuesto los trabajadores de este centro al manipular la carcasa o residuos generados por las tareas de sacrificio, considerando la positividad o negatividad de las muestras diarias se utilizó el cálculo de sensibilidad (HSe) y especificidad del rebaño (HSp) a partir de los datos individuales de la prueba diagnóstica con el uso de la fórmulas establecida por Christensen y Gardner (2000).

$$HSp=(PISp)^r=(Sp^m)^r$$

$$Hse=1-[(1-(1-P)(1-Se)+(1-P)^m PISp]^r$$

Donde:

P=proporción de infección estimada

Se= Sensibilidad de la prueba individual

Sp= Especificidad de la prueba individual

m=Muestras agrupadas

r=Muestras agrupadas por día

7.7.1. Punto de corte para definir día de riesgo.

Para considerar un día en riesgo de infectarse el personal del CFMP se consideró cuando una de las dos muestras agrupadas resulte positiva al PCR, como día de no riesgo de infección se considera cuando las dos muestras agrupadas resultan negativas al PCR.

VIII. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

8.1 Procedencia de las muestras agrupadas recolectadas en el CFMP

De un total de 75 muestras agrupadas de 40 días de muestreo en el CFMP el 70,76% correspondieron exclusivamente a la provincia de Manabí, el 13,3% a muestras compartidas Manabí y Santo domingo: el 9,33% a Santo Domingo, el 1,33% Manabí y Santa Elena, el 1,33% Santa Elena y el 4% fueron de procedencia desconocida. Los números de muestras están detallados en la tabla 3.

Tabla 3 Procedencia de las muestras agrupadas.

Procedencia	Muestras	Porcentaje
Manabí	53	70,67%
Manabí - Santo Domingo	10	13,33%
Manabí - Santa Elena	1	1,33%
Santo Domingo	7	9,33%
Santa Elena	1	1,33%
SP - NA	3	4,00%
Total	75	100,00%

8.2. Presencia de ADN de leptospira patógena en muestras de orina bovina

Del total de las muestras se identificó que el 5,33% (4/75) de las muestras agrupadas resultaron ser positivas para leptospira patógena, considerando que el 75% de las muestras agrupadas positivas provienen de la provincia de Manabí; cuando evaluamos del total de días muestreados el 10% (4/40) fueron positivos descrito en la tabla 4.

Tabla 4 Muestras positivas a PCR convencional seguido del día de observación

ID Muestra (+) PCR	Día de observación	Día
13	7	Miércoles
23	12	Miércoles
30	15	Sábado
40	20	Sábado

A continuación, se muestran las muestras 11-40 en gel de agarosa al 1,5%, teñido con Gel Start – Lonsa. Marcador de 100pb invitrogen.

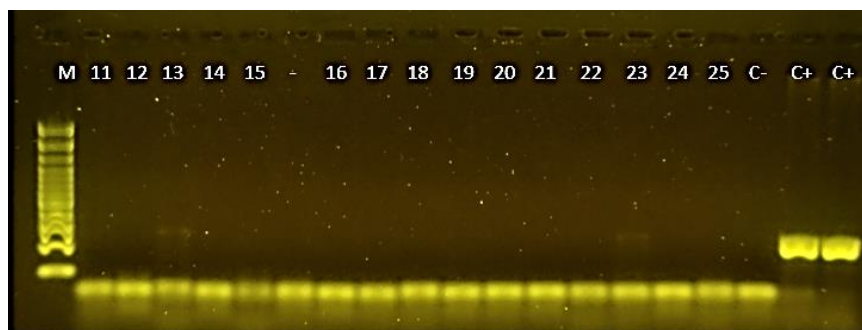


Figura 2. Generación de bandas de amplificación a hap1 (262pb) mediante PCR convencional de las muestras 13, 23

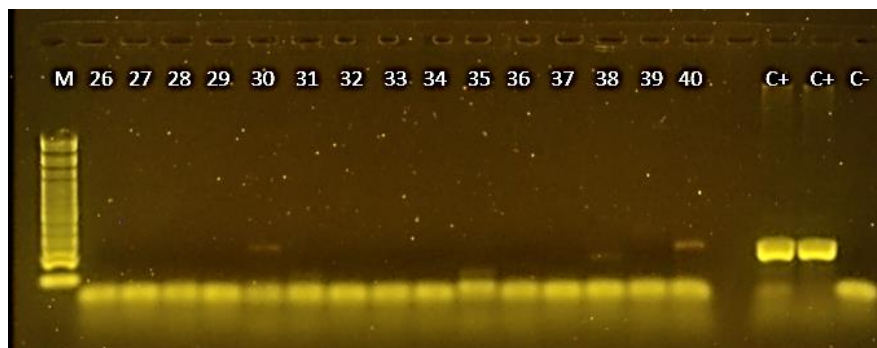


Figura 3. Generación de bandas de amplificación a hap1 (262pb) mediante PCR convencional de las muestras 30, 40

8.2. Cálculo de la probabilidad de ser un día de riesgo de infección a través del cálculo de Hse y Hsp

Para el cálculo de *Hse* y *Hsp* se asumió una prevalencia aparente de ADN de leptospira en el Centro de Faenamiento Municipal Portoviejo del 5,3%, la *Se* y *Sp* del PCR fue considerado el 90% según lo reportado por Martin y Col. (2015), para cada uno de los estimadores, obteniendo una sensibilidad de rebaño *Hse* 70% y una *Hsp* de 35%, lo que indica que los días que fueron positivos (PCR+) permite tener el 70% de certeza que es un día de riesgo, en comparación a cuando es declarado un día sin riesgo (PCR -) con un certeza del 35%.

IX. DISCUSIÓN

El resultado obtenido en la investigación identificando animales positivos a la PCR en centros de faenamientos, fue inferior a los reportados por Shafighi y Col. (2014) en Irán, Pinna (2018) en Brasil y Barbosa (2019) en la Amazonia Brasileña; donde obtuvieron un 43,0; 37,9 y 14,9% respectivamente de muestras positivas con la presencia de ADN de leptospira, esto posiblemente nos indicaría que existe un mayor riesgo de exposición en el matadero de Irán, Brasil y en la región del Baixo Tocantins en el norte de Brasil en comparación con el CFMP; sin embargo, existen diferencias metodológicas en cuanto al uso de muestras, lo que ocasiona disimilitud al tratar de compararlos; no obstante, en el presente estudio las muestras parten de una metodología de agrupamiento y probablemente podríamos generar un porcentaje más alto o igual de muestras positivas a las reportadas en otros estudios. Además debemos considerar que en los estudios realizados por Shafighi y Col., y Barbosa identifican la presencia de leptospira a partir del gen rrs que codifica para unidad ribosomal 16S el cual detecta todas las especies del género *Leptospira* (patógenas, intermedias y no patógenas) lo que ocasionaría una mayor detección de positividad al PCR; por el contrario, la investigación de Pinna (2018) trabajó sobre el mismo gen hap1; demostrando que existe mayor exposición con leptospira patógena en el Centro de faenamiento de Brasil en comparación al CFMP.

Otro estudio realizado por Sosa (2015) en el matadero de Río Chico y Calderón de la provincia de Manabí, donde recolectaron un total de 56 muestras de bovinos y porcinos mediante punción directa en la vejiga de los animales faenados; obtuvieron un 82% de las muestras con señal de amplificación en la PCR en tiempo real con los cebadores AB/CD determinando la presencia del género *Leptospira*; sin embargo, solo el 38% de las muestras mostraron bandas correspondientes en la re-amplificación con PCR convencional, secuenciaron los amplicones de las 21 muestras y solo el 17,9 tuvo homología con *L. borgpetersenii* (7muestras), *L. wolffii* (2 muestras), *L. interrogans* (1 muestra); se realizó PCR convencional con el objetivo de determinar la especificidad de la PCR en tiempo real estableciendo que el ciclo total (Ct) límite de especificidad para la PCR en tiempo real con cebadores CD es de 26 ciclos. Sin embargo, la mayoría de las muestras confirmadas positivas presentaron Ct menor a 35 ciclos en la PCR en tiempo real. Estos resultados

sugieren que a pesar de que el límite de especificidad detectado fue de 26 ciclos, se debería secuenciar amplicones de la PCR convencional que hayan presentado Ct menor a 35 ciclos en la PCR en tiempo real, esto con la finalidad de no descartar muestras positivas.

Similar técnica fue realizada por Román y Col (2016) en el cantón Loja, a partir de hembras bovinas, obteniendo el 21% de muestras amplificadas para los fragmentos AB/CD; a través de PCR convencional identificando leptospira patógena presente en orina de bovinos faenados, las especies patógenas de leptospira tienen la capacidad de producir infección sistémica e incluso colonizar riñones y aparatos reproductores.

Estudios realizados por Loor y Muñoz (2020) en Rocafuerte, y Pinna (2018) en Brasil determinaron la presencia de leptospira patógena en riñones de cerdos y bovinos, encontrando el 17,4 (53/303) y 47,1% (98/208) de muestras positivas respectivamente al PCR (+); considerando a estos animales portadores renales de leptospira; ambos estudios poseen un mayor número de muestras positivas demostrando que la colonización renal es típica de los animales reservorios como es el caso de los bovinos y cerdos; Ospina y Hernández (2015) mencionan que la infección más frecuente en el ganado porcino es la subclínica ya que los signos clínicos son inaparentes, convirtiendo a estos animales en portadores de la bacteria y eliminándola al ambiente ocasionado la diseminación del agente infeccioso a otros animales.

La técnica de PCR ha demostrado una alta tasa de detección de animales portadores de leptospira, que son asintomáticos; por lo tanto, los resultados obtenidos en esta investigación apuntan a animales eliminadores o diseminadores de la bacteria en el medio ambiente, que juegan un papel preponderante en la mantención de la infección en el ambiente y de importancia a considerar en la epidemiología de la infección.

Otra investigación realizada por Hernández y Col. (2011) en Colombia detectaron el 37% (74/200) de muestras positivas (gen rrs) por PCR, donde el 96% (71/74) amplificó para hap1, y el 4% (3/74) produjo amplicones para el gen rrl; similar estudio fue realizado por Revelo (2016) en Manabí, encontrando el 13,9% (10/72) de muestras positivas para el gen rrs, el 11,1% (8/72) para hap1 y ninguna amplificó para el gen rrl, evidenciando que existe

una mayor infección detectada a leptospira patógena en comparación al estudio realizado en el CFMP.

En un estudio realizado en Chile por Matamala (2018), donde utilizaron 9 animales de los cuales solo 1 resultó positivo a leptospira patógena, utilizando el gen lipL32 con el fin de diagnosticar la causa de aborto por leptospira patógena en los primeros 7 días post aborto recordando que la leptospira patógena permanece en sangre en la fase de bacteremia hasta por siete días desde la exposición, lo que es seguido por la migración de las bacteria hacia los órganos blanco, a medida que las leptospiras bajan en concentración en sangre y órganos blanco, los anticuerpos se elevan a partir de la primera semana post infección formando un nivel detectable entre los 7-14 días entendiéndose entonces que en el animal que dio positivo la bacteria ya se encuentra en su etapa de migración hacia los tejidos blanco, en este caso siendo el riñón uno de estos órganos y así permitiendo la eliminación por la orina.

En el presente estudio del CFMP se empleó un método de agrupamiento en las muestras (pooled sample); este método de detección combina muestras de algunos animales; donde se analiza la muestra combinada, si es negativo, todos los miembros del grupo reciben un resultado negativo de inmediato, lo que ahorra el costo de analizar a cada animal; sin embargo, si el grupo de muestras es positivo, cada muestra individual dentro del grupo debería volver a analizarse para identificar que muestra procedente del grupo está causando que la prueba sea positiva, diferenciándose de los estudios donde se analizan muestras individuales como es el caso de todas las investigaciones mencionadas anteriormente.

Estudios realizados por Román y Sosa utilizaron en sus investigaciones qPCR, según lo mencionado por Costa (2004), este proporciona datos más precisos y exactos para la cuantificación, midiendo la amplificación por PCR a medida que se produce, dicha técnica posee ventajas como sencillez, rapidez y menor riesgo de contaminación. Ambos estudios utilizaron reamplificación mediante PCR convencional; al igual que, Revelo, Hernández, Barbosa, Pinna, el cual mide la cantidad de producto total al final de los ciclos de amplificación y que puede proporcionar resultados “semi-cuantitativos” ya que posee desventajas en cuanto a la precisión de los resultados.

X. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se logró llegar a las siguientes conclusiones:

- La prueba diagnóstica de PCR permitió detectar el 5,3% (4/75) de muestras agrupadas positivas para leptospira patógena.
- Existe riesgo de infección en el personal que labora en el Centro de Faenamiento Municipal Portoviejo; al observar que el 10% de los días analizados se detecta presencia de ADN de leptospira patógena dentro de la orina de los animales sacrificados.

XI. RECOMENDACIONES

- Difundir los resultados dentro del personal que trabaja en el CFMP para que exista concientización en el uso de Equipos de protección personal para evitar el riesgo de infección al entrar en contacto con animales infectados.
- Debido a la positividad encontrada de ADN de leptospira patógena en el presente estudio, es de gran importancia implementar medidas de bioseguridad en el CFMP, para así brindar protección al personal que manipula a los animales durante el proceso de faenamiento.
- Es recomendable seguir realizando investigaciones que profundicen este tema, debido a que esta enfermedad posee un gran impacto en la salud pública.

XII. PRESUPUESTO

UNIDADES	DESCRIPCIÓN	COSTO UNITARIO	COSTO TOTAL
1	Congelador	350,00	350,00
1	Agua destilada	45,00	45,00
2	Microtubos	18,00	36,00
1	Proteinasa K	201,60	201,60
1	Puntas con filtro 100-1000 uL	93,00	93,00
1	Puntas con filtro 20-200 uL	90,00	90,00
1	Puntas con filtro 0.1-10 UI	88,50	88,50
1	TRIS	155,00	180,00
1	SDS	298,00	298,00
1	EDTA	140,00	165,00
1	Puntas con filtro 10 uL	82,00	82,00
1	Tubo PCR individual 0.2ml tapa plana	62,00	62,00
2	Caja plástica para almacenar	50,00	100,00
1	Tubera con tapa	45,00	45,00
1	Taq platinum DNA polymerase	160,00	160,00
1	GeneRuler 50 bp DNA ladder, ready-to-use	120,00	120,00
1	Ultrapure DNA typing grade	173,00	173,00

1	dNTP Mix	168,00	168,00
1	DNA gel loading Dye	58,00	58,00
1	Tubera con tapa	45,00	45,00
1	SYBR safe DNAgel stain	108,00	108,00
1	5'GCA AGC ATT ACC GCT TGT GG 3'	24,00	24,00
1	5' TGT TGG GGA AAT CAT ACG AAC 3'	25,00	25,00
1	Agarosa ultra pure	255,00	255,00
1	Antibiotico	196,46	196,46
3	High Pure PCR Template Preparation Kit	382,52	1.147,56
1	Trackit 100bp DNA ladder	121,00	121,00
1	Taq DNA polymerase	135,00	135,00
1	Aire Acondicionado	209,82	209,82
1	Sondas Taq Man Lip L32	563,00	563,00
16	Primers	25,14	402,00
	Material de PCR	2,594.32	2,594.32
SUBTOTAL			8,341.26
IVA 12%			1,000.95
TOTAL			9,342.21

XIII. CRONOGRAMA

ACTIVIDADES /MESES	2020				2021										
	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Aprobación del proyecto	X														
Compra de materiales		X	X		X	X									
Procesamiento de muestras en el laboratorio				X			X								
Procesamiento de muestras en Agrocalidad								X	X	X					
Análisis de resultados												X	X		
Informe final de														X	

la tesis															
Incorporación															X

XIV BIBLIOGRAFÍA

1. Adler, B., de la Pena Moctezuma, A., 2010. *Leptospira* y leptospirosis. *Vet Microbiol* 140, 287-296.
2. Andicoberry, A., García, F., & Ortega, L. (2001). Epidemiología, diagnóstico y control de la leptospirosis bovina. Obtenido de <http://www.inia.es/iaspa/2001/vol16-2/alons.PDF>
3. Arias, Suárez, Huanca, Rivera, Camacho, Huanca (2011). Prevalencia de leptospirosis bovina en dos localidades de Puno en época de seca y determinación de factores de riesgo. *Rev In Vet*, 167-170.
4. Ariza, Á., & Berdugo, C. (2017). Actualización de la leptospirosis bovina en Colombia. *Conexión Agropecuaria JDC*, Vol 7 No. 1, pp. 57-77.
5. Baquero, M., Gómez, A., & Hernández, P. (2010). Relevant molecular aspects of leptospiral pathogenicity proteins. *Rev Med Vet*, 104.
6. Barbosa, I., Almeida, A., Oliveira, G., Oliveira, S., Taniwaki, S., Cortez, A., . . . Heinemann, M. (2019). Circulating *Leptospira* species identified in cattle of the Brazilian Amazon. *Acta Tropica*, 212-216.
7. Benneett, Dolin , & Blaser . (2021). *Enfermedades Infecciosas Principios y práctica*. Barcelona, España: ELSEVIER.
8. Branger, C., Blanchard, B., Fillonneau, C., Suard, I., Aviat, F., Chevallier, B., & Fontaine, A. (2005). Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. *FEMS Microbiology Letters Volumen 243*, 437-445.

9. Brihuega, B. (2008). Leptospirosis: Diagnóstico y Tipificación de leptospiras. Obtenido de <http://helminto.inta.gob.ar/patobiologia/Pdf%20leptospirosis/LEPTOSPIROSIS%20DIAGNOSTICO%20Y%20TIPIFICACION.pdf>
10. Cagliero, J., Villanueva, S., & Matsui, M. (2018). Leptospirosis Pathophysiology: Into the Storm of Cytokines. *Front. Cell. Infect. Microbiol Volumen 8*, 1-8.
11. Castillo, M. (2014). Leptospira en ganado bovino. [Título Profesional, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro]. Repositorio UAAAN. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/7131/MARISOL%20CASTILLO%20HERN%C3%81NDEZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
12. César, D. (2003). Leptospirosis. *Plan Agropecuario*, 43-45
13. Chavarría, L., Lara, D., Méndez, W., & Moscoso, J. (2015). Leptospira: review of the causal agent of a zoonotic disease. *Biociencias*, 65-80.
14. Chávez, Á. (2012). Clasificación molecular de Leptospira patógena aisladas de orinas de animales domésticos, roedores y aguas ambientales en Nicaragua en 2012 mediante PCR tiempo real. [Título Profesional, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua]. <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/3410/1/226712.pdf>
15. Christensen J, Gardner IA. 2000 Herd-level interpretation of test results for epidemiologic studies of animal diseases. *Prev Vet Med.* 2000;45(1-2):83-106. doi:10.1016/s0167-5877(00)00118-5

16. Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *ScienceDirect Volume 22*, 299-305.
17. Ferrari, Ó. (2020). PCR: historia de una revolución biomédica. Obtenido de http://www.savnet.cl/mundo-medico/reportajes/pcr-historia-de-una-revolucion_biomedica.html
18. Francois, S., Brihuega, B., Grune, S., Gattarello, M., Correa, D., Petrakovsky, J.,... Arestegui, M. (2013). Aislamiento de *Leptospira borgpetersenii* de fuentes de agua en Argentina. *Rev Cubana Med Trop vol.65*, 177-184.
19. Gallo. (2003). Leptospirosis un problema humano y animal. Obtenido de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/29667/Documento_completo.pdf?sequence=1
20. García, R., Reyes, A., Basilio, D., Ramírez, M., & Rivas, B. (2013). Leptospirosis; un problema de salud pública. *Rev Latinoamer Patol Clin*, 57-70.
21. Gibello, A., Blanco, M., Domínguez, L., & Fernández, J (2001). Utilización de la PCR. *Rev AquaTIC 15*.
22. Google Maps (2017).[Centro de Faenamiento Municipal Portoviejo]. Obtenido de <https://goo.gl/maps/TSyXJGCfX2wReKJD6>
23. González, F., & Rivera, S. (2015). Caracterización de la leptospirosis bovina en Venezuela. *Redvet vol 16*, 1-22.
24. González, K. (2018). Leptospirosis bovina. Obtenido de <https://zoovetesmpasion.com/ganaderia/enfermedades-bovinas/leptospirosis-bovina/>

25. Haake, D., Chao, G., Zuerner, R., & Bolin, C. (2000). The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 Is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection. *ASM Journals vol. 68*, 2276-2285. doi/full/10.1128/IAI.68.4.2276-2285.2000
26. Haneke, J., & Barrabes, S. (2017). Ventajas del Diagnóstico Veterinario por PCR. Obtenido de <https://avicultura.info/ventajas-del-diagnostico-veterinario-pcr/>
27. Hernández, P., Díaz, C., Dalmau, E., & Quintero, G. (2011). A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. *ELSEVIER*, 1-7. doi:10.1016/j.mimet.2010.10.021
28. Howlett, B., Rogo, E., & Shelton, T. G. (2021). Evidence Based Practice for Health Professionals. World Headquarters. Jones & Bartlett Learning.
29. Latifah, I., Abdul Halim, A., Rahmat, M. S., Nadia, M. F., Ubil, Z. E., Asmah, H., Shafariatul Akmar, I., Picardeau, M., Siti Haslina, O., & Nasir, M. A. (2017). Isolation by culture and PCR identification of LipL32 gene of pathogenic *Leptospira* spp. in wild rats of Kuala Lumpur. *The Malaysian journal of pathology*, Obtenido de <http://www.mjpath.org.my/2017/v39n2/LipL32-gene.pdf>
30. Leal, V., Montes, V., Alocilla, O., Avilez, C., Tejeda, C., Salgado, M., Monti, G. Vertical and Horizontal transmission of pathogenic leptospira in newborn and neonatal calves. 10th Scientific Meeting of International Leptospirosis Society, Palmerston North, New Zealand, 27 November-1st December 2017 (Poster presentation).
31. Lee, S., Kim, K., Park, Y., Seong, I. W., Kim, M., & Lee, Y. (2000). Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar lai. *ELSEVIER*, 19-28. doi:10.1016/s0378-1119(00)00293-6

32. Levett, P. (2014). Systematics of Leptospiraceae. Obtenido de https://scihub.se/10.1007/978-3-662-45059-8_2
33. Looor & Muñoz. (2020). Lesiones renales en cerdos de matadero compatibles con leptospirosis porcina [Título Profesional, Universidad Técnica de Manabí].
34. Luna, M., Morales, L., Nava, C., & Salazar, F. (2005). Estudio retrospectivo de seroprevalencia de leptospirosis bovina en México considerando las regiones ecológicas. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S037507602005000100005&script=sci_arttext&lng=pt
35. Martin, P., Arauz, M., & Stanchi, N. (2015). Diagnóstico de leptospirosis mediante técnicas moleculares: ventajas y limitaciones. Obtenido de http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/186-Martin.pdf
36. Matamala. (2018). Evaluación de la Prueba MAT Y PCR En Sangre y Orina para Determinar el Estatus de Infección de Vacas Lecheras [Título Profesional, Universidad Austral de Chile]. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2018/fvm971e/doc/fvm971e.pdf>
37. Montes, V., Monti, G., Avilez, C., Tejeda, C., Salgado, M. Assessment of urine shedding of pathogenic leptospira in naturally infected dairy cattle. 10th Scientific Meeting of International Leptospirosis Society, Palmerston North, New Zealand, 27 November-1st December 2017 (Oral presentation).

38. Nieves, C. (2021). Estudios genómicos y moleculares de bacterias del género *Leptospira*: análisis de la variabilidad genética y contribución en diagnóstico y tipificación [Tesis de Maestría, Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas]. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/23242/1/uy24-19060.pdf>
39. Odriozola, E. (2001). Leptospirosis. *Revista El Sitio de la Producción Animal* Obtenido de http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/62-leptospirosis.pdf
40. Ospina, M., & Hernández, P. (2015). Utilidad de las herramientas moleculares para la identificación de *Leptospira* spp. en muestras humanas, animales y ambientales. *Rev Med Trop vol.67*.
41. Pinna, MH, Martins, G., Loureiro, AP y Lilenbaum, W. (2018). Detección de portadores bovinos de *Leptospira* mediante herramientas serológicas, bacteriológicas y moleculares. *Sanidad y producción de animales tropicales*, 50 (4), 883–888. doi: 10.1007 / s11250-018-1512-z
42. Rada Bríñez, I.X. (2018). Revisión bibliográfica de algunas enfermedades de origen infeccioso que causan aborto en bovinos [Tesis de pregrado]. Obtenido de: https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/6207/6/2018_revision_bibliografica_algunas.pdf
43. Retamal, P., & Abalos, P. (2019). Enfermedades animales producidas por agentes biológicos. Santiago de Chile: Universitaria.

44. Revelo, A; 2016 Optimización de un protocolo de extracción de ADN genómico de leptospira spp a partir de muestras de orina para el diagnóstico de leptospirosis bovina por PCR [Tesis de Grado, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Central del Ecuador]. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/11987>
45. Román, F., Chavez, K., & Chávez, R. (2016). Identificación Molecular de Leptospira spp., Presente en el Ganado Lechero del Cantón Loja Ecuador. *Revista Centro de Biotecnología* 5, 63 -71
. https://issuu.com/universidadnacionaldeloja/docs/revista_biotecnolog__a_5_-_enviar
46. Romero-Vivas, Claudia M y Falconar, Andrew K. (2016). Leptospira spp. y leptospirosis humana. *Revista Salud Uninorte* , 32 (1), 123-143.
<https://doi.org/10.14482/sun.32.1.8479>
47. Romero Peñuela, Marlyn Hellen, Sánchez Valencia, Jorge Alberto, González Gordon, Lina María. (2011).Revisión Sobre la Importancia de la Fauna Silvestre en la Epidemiología de la Leptospirosis. *Biosalud*, 10(2), 112-122.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95502011000200011&lng=en&tlng=es.
48. SAG (Secretaria de Agricultura y Ganadería). (2015). Leptospirosis. Obtenido de https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/f_tecnica_leptospirosis.pdf
49. Sedano S, André, Pinto J, Chris E, Siuce M, Juan, & Calle E, Sonia. (2016). Estandarización de una Técnica de PCR en Tiempo Real con Sondas TaqMan para la Detección de Leptospira spp Patógenas en Orina de Canes Domésticos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 27(1), 158-168.
<https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v27i1.11454>

50. Shafighi, T., Zahraei Salehi, T., Abdollahpour, G., Asadpour, L., Akbarein, H., & Salehzadeh, A. (2014). Molecular detection of *Leptospira* spp. in the urine of cattle in northern Iran. *Iranian journal of veterinary research*, 15(4), 402–405. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4789221/>
51. Stoddard RA. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through real-time PCR (qPCR) targeting the LipL32 gene. *Methods Mol Biol.* 2013;943:257-66. doi: 10.1007/978-1-60327-353-4_17. PMID: 23104295.
52. Sosa, A. (2015). Detección de *Leptospira* en el Cantón Portoviejo (Manabí). Obtenido de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/4887/1/120361.pdf>
53. Ricardo, T., Monje, L., Landolt, N., Chiani, Y., Schmeling, F., Beldoménico, P., . . . Previtali, A. (2018). First report on *Leptospira interrogans* in the sigmodontine rodent *Scapteromys aquaticus*. *Rev Panam Salud Publica*.
54. Thibeaux , R., Iraola, G., Ferrés , I., Bierque, E., Girault, D., Soupé, M., . . . Goarant, C. (2018). Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. *MICROBIAL GENOMICS* , 4, 1,2,3 . Obtenido de <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/mgen/10.1099/mgen.0.000144>
55. 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.
56. Vincent, A., Schiettekatte, O., Goarant, C., Kumari Neela, V., Bernet, E., Thibeaux, R., . . . Picardeau, M. (2019). Revisiting the taxonomy and evolution of

pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. PLOS Neglected Tropical Diseases

57. Yunes, A., Feula, P., & Echevarría, H. (2016). Descripción de leptospirosis en rodeos de cría y discusión de un caso sospechoso de leptospirosis. [Título Profesional, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires]. <https://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/639/Tesis%20Yunes,%20Alejo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

XV. ANEXOS

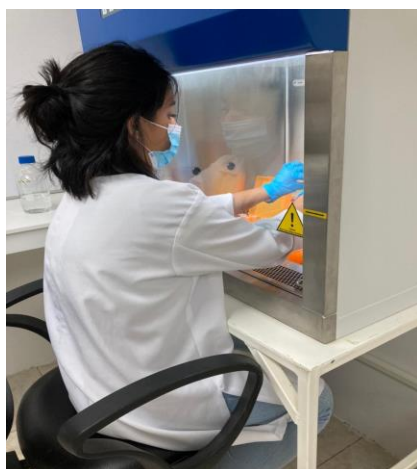
Anexo 1.- Recolección de muestras en el CFMP.

Extracción de orina bovina, mediante cistocentesis con jeringas estériles.



Anexo 2.- Procesamiento y extracción de ADN en el laboratorio de Leptospira de la UTM.

Agrupamiento de muestras mediante técnica pooled samples y tratamiento con PBS (Phosphate buffered saline).



Proceso de extracción de ADN de las muestras



Centrifugación de las muestras



*Aplicación del Buffer de lisis y
Proteinasa K*



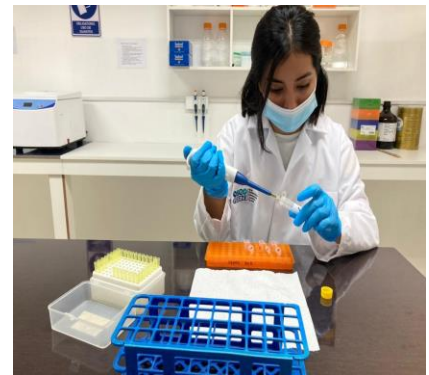
*Incubación de las muestras en el
termobloque*



*Precipitación de la muestra con
etanol*



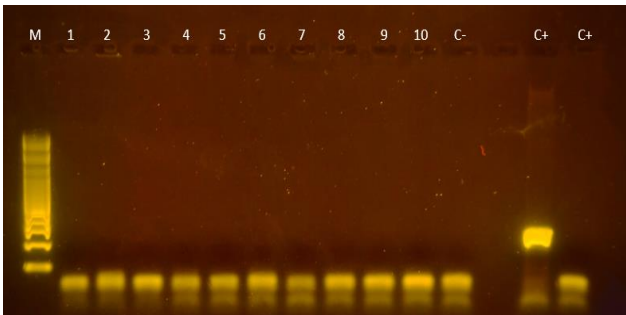
*Secado con la tapa hacia abajo para
eliminar el resto de etanol*



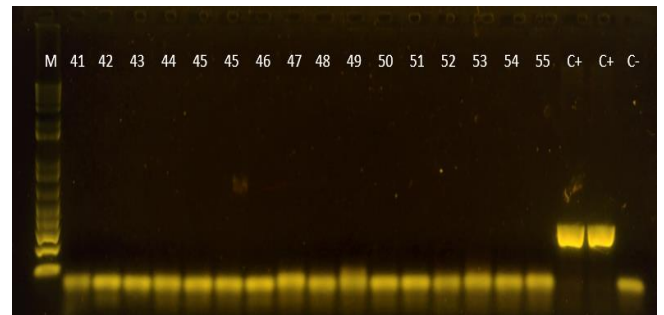
*Se añade agua de PCR, guardar el
ADN a -20°C hasta su uso*

Anexo 3.- Electroforesis en gel de agarosa obtenidos del laboratorio de Biología

Molecular de AGROCALIDAD Tumbaco- Quito.



*Corridas en gel de las muestras 1-10. Gel de agarosa al 1,5%,
teñido con Gel Start – Lonsa. Marcador de 100pb invitrogen. El
segundo control + fallo en amplificación.*



*Corridas en gel de las muestras 41-55. Gel de agarosa al 1,5%,
teñido con Gel Start – Lonsa. Marcador de 100pb
invitrogen.*

Anexo 4.- Procedencia e identificación de las muestras agrupadas positivas.

Procedencia	Agrupamiento	Días de muestreo	ID PCR
Manabí	NA	7	13
	Calderón		
	Calderón		
	Santa Ana		
	Rocafuerte		
Manabí - Santo Domingo	Chone	12	23
	Chone		
	Santa Ana		
	SP		
	Santo Domingo		
Manabí	Chone	15	30
	Chone		
	Chone		
	Chone		
	Chone		
Manabí	Pichincha	20	40
	24 de Mayo		
	Chone		
	Chone		
	Junín		
	24 de Mayo		
	Chone		
	Chone		
	Junín		

 AGROCALIDAD AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL, FITO Y ZOO-SANITARIO	LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR Vía Interoceánica Km. 14½ y Eloy Alfaro, Granja del MAG, Tumbaco - Quito Teléf.: (02) 3828860 ext. 2030	PGT/BM/09-FO01
	INFORME DE ANÁLISIS	Rev. 7 Hoja 1 de 2

Informe N°: LN-BM-I21-0418
 Fecha emisión Informe: 02/08/2021

DATOS GENERALES

Cliente ¹ : UTM	Dirección ¹ : vía Portoviejo – Santa Ana, parroquia Lodana
Propietario ¹ : Laboratorio de leptospira UTM	N° de Orden de Trabajo: BM-21-CGLS-539
Nombre del predio ¹ : no informa	Quípux o Factura: 000487-M
Provincia ¹ : Manabí	Dirección Predio ¹ : no informa
Parroquia ¹ : Lodana	Cantón ¹ : Santa Ana
Motivo del Análisis: convenio	Especie ¹ : bovino
Fecha de recepción de la muestra: 06/07/2021	N° y Tipo de muestra ¹ : 75 muestras de ADN
Fecha de muestreo ¹ : 20/04/2021	Muestreado por ¹ : no informa
Fecha de inicio del análisis: 06/07/2021	Diagnóstico solicitado ¹ : Leptospira / PCR convencional
	Fecha finalización del análisis: 02/08/2021

Identificación del Animal¹ (si aplica): NA

RESULTADOS DEL ANÁLISIS

Código o Identificación de la muestra/Método/Técnica/Resultados/Unidades (si aplica):

CÓDIGO DE MUESTRA LABORATORIO	IDENTIFICACIÓN DE CAMPO DE LA MUESTRA ¹	TIPO DE MUESTRA ¹	MÉTODO	PARÁMETROS ANALIZADOS	RESULTADOS
BM-21-0956	1	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0957	2	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0958	3	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0959	4	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0960	5	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0961	6	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0962	7	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0963	8	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0964	9	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0965	10	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0966	11	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0967	12	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0968	13	ADN		Leptospira	POSITIVO
BM-21-0969	14	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0970	15	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0971	16	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0972	17	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0973	18	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0974	19	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0975	20	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0976	21	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0977	22	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0978	23	ADN		Leptospira	POSITIVO
BM-21-0979	24	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0980	25	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0981	26	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0982	27	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0983	28	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0984	29	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0985	30	ADN		Leptospira	POSITIVO
BM-21-0986	31	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0987	32	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0988	33	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0989	34	ADN		Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0990	35	ADN		Leptospira	NEGATIVO

Nota: El resultado corresponde únicamente a la muestra entregada por el cliente en esta fecha. Está prohibida la reproducción parcial o total de este informe sin autorización del laboratorio.

¹ Datos suministrados por el cliente: El laboratorio no se responsabiliza por esta información.



AGROCALIDAD
AGENCIA DE REGULACIÓN Y
CONTROL. FRO Y ZOOSANITARIO

LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

Vía Interoceánica Km. 14½ y Eloy Alfaro, Granja del MAG,
Tumbaco - Quito
Teléf.: (02) 3828860 ext. 2030

INFORME DE ANÁLISIS

PGT/BM/09-FO01

Rev. 7

Hoja 2 de 2

Informe N°: LN-BM-I21-0418

Fecha emisión Informe: 02/08/2021

BM-21-0991	36	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0992	37	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0993	38	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0994	39	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0995	40	ADN	Leptospira	POSITIVO
BM-21-0996	41	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0997	42	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0998	43	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-0999	44	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1000	45	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1001	46	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1002	47	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1003	48	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1004	49	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1005	50	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1006	51	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1007	52	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1008	53	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1009	54	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1010	55	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1011	56	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1012	57	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1013	58	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1014	59	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1015	60	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1016	61	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1017	62	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1018	63	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1019	64	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1020	65	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1021	66	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1022	67	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1023	68	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1024	69	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1025	70	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1026	71	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1027	72	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1028	73	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1029	74	ADN	Leptospira	NEGATIVO
BM-21-1030	75	ADN	Leptospira	NEGATIVO

Límites de referencia (si aplica): NA

Analizado por: Ing. David Jarrín

Observaciones: Los resultados se aplican a la muestra cómo se recibió. El ensayo se realizó con controles positivos y controles negativos.

Revisado por Ing. David Jarrín.

Anexo Gráficos o Anexo Documentos (si aplica):



Firmado electrónicamente por:
DAVID ALEJANDRO
JARRÍN ESCUDERO

Ing. David Jarrín
Responsable Técnico
Laboratorio de Biología Molecular

Nota: El resultado corresponde únicamente a la muestra entregada por el cliente en esta fecha. Está prohibida la reproducción parcial o total de este informe sin autorización del laboratorio.

¹ Datos suministrados por el cliente: El laboratorio no se responsabiliza por esta información.