



Universidad
Nacional
de Loja

Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

Carrera de Medicina Veterinaria

“Detección de *Leptospira* spp. en cuyes de la parroquia Chuquiribamba del cantón Loja”

Trabajo de Titulación previo a
la obtención del título de Medica
Veterinaria Zootecnista.

AUTORA:

Claudia Stefania Quizhpe Criollo

DIRECTORA:

Mvz. Jhuliana Katherine Luna Herrera, Mg. Sc.

Loja – Ecuador

2024

Certificación

Loja, 20 de marzo de 2023

Mvz. Jhuliana Katherine Luna Herrera. Mg.Sc.

DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

C E R T I F I C O:


Que he revisado y orientado todo el proceso de elaboración del Trabajo de Titulación denominado: **Detección de *Leptospira* spp. en cuyes de la parroquia Chuquiribamba del cantón Loja**, previo a la obtención del título de **Medica Veterinaria Zootecnista** de la autoría de la estudiante **Claudia Stefania Quizhpe Criollo**, con **cédula de identidad Nro.1150589446**, una vez que el trabajo cumple con todos los requisitos exigidos por la Universidad Nacional de Loja, para el efecto, autorizo la presentación del mismo para su respectiva sustentación y defensa.

Mvz. Jhuliana Katherine Luna Herrera. Mg. Sc.

DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Autoría

Yo, **Claudia Stefania Quizhpe Criollo**, declaro ser autora del presente Trabajo de Titulación y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos y acciones legales, por el contenido del mismo. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación de mi Trabajo de Titulación, en el Repositorio Digital Institucional – Biblioteca Virtual.

Firma: 

Cédula de Identidad: 1150589446

Fecha: 05 de febrero de 2024

Correo electrónico: claudia.s.quizhpe@unl.edu.ec

Celular: 0991958072

Carta de autorización por parte de la autora, para consulta, reproducción parcial o total, y/o publicación electrónica de texto completo, del Trabajo de Titulación.

Yo **Claudia Stefania Quizhpe Criollo**, declaro ser autora del presente Trabajo de Titulación denominado: “**Detección de *Leptospira* spp. en cuyes de la parroquia Chuquiribamba del cantón Loja**”, como requisito para optar el título de **Médica Veterinaria Zootecnista**, autorizo al sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que, con fines académicos, muestre la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido en el Repositorio Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el Repositorio Institucional, en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia del Trabajo de Titulación que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los cinco días del mes de febrero de dos mil veinticuatro.

Firma: 

Autora: Claudia Stefania Quizhpe Criollo

Cédula: 1150589446

Dirección: Loja, Las Palmeras, parroquia Sucre

Correo electrónico: claudia.s.quizhpe@unl.edu.ec

Teléfono: 0991958072

DATOS COPLEMENTARIOS:

Directora del Trabajo de Titulación: Mvz. Jhuliana Katherine Luna Herrera, Mg. Sc.

Dedicatoria

Agradezco inmensamente a Dios por darme la sapiencia para elegir el camino correcto. Este y todos los logros que alcancé en mi vida se los dedico primeramente a Dios, por haberme premiado con una abuela maravillosa que siempre me apoyó y guio en el transcurso de mi carrera por unos padres excepcionales que son mi ejemplo y mi fortaleza, a mi perrito mi ángel de apoyo emocional por acompañarme todas las noches en los desvelos, a mis hermanos por ser ese rayito de luz en mis días difíciles, a todos aquellos que formaron parte de este sueño por ser mi inspiración, son lo más valioso que tengo y por sus palabras de ánimo, fuerza y entusiasmo.

Con cariño, me dedico a mí mismo/a, porque este logro es el resultado de mucho esfuerzo y me demuestra que todo aquello que sueñes con el corazón será posible. Les agradezco infinitamente por su apoyo y amor incondicional.

Muchas gracias a todos.

Claudia Stefania Quizhpe Criollo

Agradecimiento

Expreso mi amor infinito y sincero a Dios por guiarme con sabiduría en cada pequeño paso que decidí seguir para cumplir mis sueños, a mi querida y noble abuela Susana Salinas que hoy, aunque no esté presente para nuestro logro se ha convertido en mi ángel que me seguirá guiando desde el cielo con el mismo amor puro de siempre, a mis padres Laura Criollo y Juan Quizhpe por no soltar mi mano en los momentos más difíciles, por sus valores inculcados y especialmente a mi madre por cada uno de sus esfuerzos, a mis hermanos José y Katherine por ser luz en días oscuros, por apoyarme en cada una de mis locuras para que este sueño que parecía imposible se ha convertido en un sueño posible, a mis perritos por su amor incondicional.

Mi agradecimiento sincero a quienes, de una u otra forma, han hecho posible este gran sueño. Mi profundo agradecimiento a la Médica Veterinaria Zootecnista, Mg. Sc. Jhuliana Katherine Luna Herrera, quien me guio y asesoró con persistencia y determinación a través de su amplio conocimiento para culminar un proyecto fructífero.

Claudia Stefania Quizhpe Criollo

Índice de contenidos

Portada.....	i
Certificación.....	ii
Autoría.....	iii
Carta de autorización.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento.....	vi
Índice de contenidos.....	vii
Índice de tablas:.....	ix
Índice de Figuras:.....	x
Índice de anexos:.....	xi
1. Título.....	1
2. Resumen.....	2
Abstract.....	3
3. Introducción.....	4
4. Marco Teórico.....	6
4.1 Etiología.....	6
4.1.1. Características morfológicas y microbiológicas de <i>Leptospira</i> spp.	6
4.2. Clasificación de <i>Leptospira</i> spp.	8
4.2.1. Clasificación taxonómica.....	9
4.2.2. Clasificación fenotípica.....	9
4.2.3. Clasificación genotípica.....	11
4.2.4. Clasificación serológica.....	11
4.3. Transmisión.....	12
4.4. Patogenia.....	13
4.5. Manifestaciones clínicas.....	14
4.6. Lesiones.....	16

4.7. Diagnóstico	16
4.7.1. Método de MAT	16
4.8. Reacción en Cadena de la Polimerasa para diagnóstico de leptospirosis	17
4.9. Tratamiento	18
4.10. Prevención.....	18
4.11. Epidemiología	19
5. Metodología.....	20
5.1. Localización del estudio	20
5.2. Diseño del estudio	20
5.3. Tipo de muestreo de animales y tamaño de muestra	20
5.4. Transporte, identificación de los animales y registro de información individual ..	21
5.6. Eutanasia y necropsia	21
5.7. Protocolos de bioseguridad para obtención de muestras y laboratorio	22
5.8. Toma y conservación de muestras	22
5.9. Detección de <i>Leptospira</i> patógena mediante PCR convencional a partir de	
muestras de orina	22
5.9.1. Replicación del ADN.....	23
5.9.2. Electroforesis y lectura en gel de agarosa.....	23
5.10. Diagnóstico serológico mediante MAT (aglutinación microscópica)	23
6. Resultados	24
6.1. Resultados de la identificación del gen <i>hap1</i>	24
6.2. Resultados de los tipos de serovares y títulos serológicos.....	25
7. Discusión	26
8. Conclusiones	30
9. Recomendaciones	31
10. Bibliografía	32
11. Anexos	43

Índice de tablas:

Tabla 1. Clasificación de serogrupos/serovariedades de *Leptospira* spp..... 10

Tabla 2. Número de animales muestreados, de acuerdo al tamaño del predio..... 21

Índice de Figuras:

Figura 1. Pared celular de <i>Leptospira</i>	7
Figura 2. Estudio Ultraestructural de <i>Leptospira</i>	7
Figura 3. Filogenia del género <i>Leptospira</i>	9
Figura 4. Mapa de la parroquia de Chuquiribamba.....	20
Figura 5. Resultado de electroforesis de detección molecular de <i>Leptospira</i> spp.	24

Índice de anexos:

Anexo 1. Compra de los cobayos.....	43
Anexo 2. Procedimiento por técnica de concusión	43
Anexo 3. Toma de muestras de sangre	44
Anexo 4. Toma de muestras de orina.....	44
Anexo 5. Obtención de las muestras de sangre y orina	45
Anexo 6. Centrifugación de las muestras de sangre	45
Anexo 7. Obtención de suero sanguíneo.....	45
Anexo 8. Muestras de orina para ser procesadas	46
Anexo 9. Muestras de orina en termociclador	46
Anexo 10. Proceso de PCR convencional.....	46
Anexo 11. Proceso de replicación y duplicación del ADN.....	47
Anexo 12. Proceso de electroforesis	47
Anexo 13. Resultados	47
Anexo 14. Certificado de traducción del resumen.....	48

1. Título

**“Detección de *Leptospira* spp. en cuyes de la parroquia
Chuquiribamba del cantón Loja”**

2. Resumen

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa causada por bacterias del género *Leptospira*, que se propaga a través de la orina de animales infectados. Esta enfermedad representa un desafío de salud pública a nivel mundial, afectando tanto a países en desarrollo como a los desarrollados. En animales de producción, como el ganado, puede provocar problemas como abortos, infertilidad, momificación, aumento de la mortalidad neonatal y disminución de la producción, lo que resulta en pérdidas económicas significativas. En la presente investigación observacional de corte transversal se realizó la detección de *Leptospira* patógena mediante PCR convencional (gen *hap1*) en 85 cobayos de la parroquia Chuquiribamba a partir de muestras de orina, además se detectaron anticuerpos de animales eliminadores de la bacteria mediante serología por MAT (OIE, 2021). Se detectaron dos animales positivos a PCR (2,35%) pero una de estas muestras fue negativa en MAT. Lo encontrado evidencia la necesidad de monitorear la enfermedad especialmente en animales domésticos, permitiendo sugerir medidas de control adecuadas que reduzcan el riesgo de infección en animales y el ser humano como especie susceptible accidental.

Palabras claves: *Cavia porcellus*, *Leptospira* spp., *hap1*

Abstract

Leptospirosis is an infectious disease caused by pathogenic bacteria of the genus *Leptospira* which is spread through the urine of infected animals. This disease represents a global public health challenge, affecting both developing and developed countries. In production animals, such as cattle, it can cause problems such as abortions, infertility, mummification, increased neonatal mortality and decreased production, resulting in significant economic losses. In the present observational cross-sectional study, pathogenic *Leptospira* was detected by conventional PCR (hap1 gene) in 85 guinea pigs from Chuquiribamba parish from urine samples, and antibodies were also detected in animals eliminating the bacterium by serology by MAT (OIE, 2021). Two PCR positive animals were detected (2,35%) but one of these samples was negative in TMA. This finding evidences the need to monitor the disease especially in domestic animals, allowing to suggest adequate control measures to reduce the risk of infection in animals and humans as accidental susceptible species.

Keywords: *Cavia porcellus*, *Leptospira* spp., *hap1*.

3. Introducción

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica, que se puede contraer cuando la bacteria, proveniente de animales infectados naturalmente se propagan en el agua o suelo, teniendo las condiciones necesarias para su transmisión al momento que entra en contacto con el huésped (Bautista, 2019).

Leptospira spp. ocasiona infecciones en una variedad de huéspedes animales que incluye los roedores y otros mamíferos, mientras que los humanos sirven como hospedadores casuales, los animales domésticos y silvestres en estado de portador pueden dispensar leptospiras intermitentemente por muchos años o hasta durante toda la vida (Chacón, 2014). En animales de producción, provoca gran bajas en la economía económicas que produce, desencadenando trastornos en la reproducción, abortos, infertilidad, nacimiento de crías débiles y mortinatos (Peña, 2014)

El dispendio por año es de 116 500 cantidades de carne, proviene del patrocinio de más de 65 millones de cuyes producidos (Zaldivar, 2007). En Ecuador él cobayo tiene una gran demanda en las zonas del área Andina la población estimada es de 15 millones de cuyes (Calvopiña, 2018).

El cuy es un alimento de alto valor biológico, el cual beneficia a gran número de familias con la seguridad alimentaria especialmente a la población rural de escasos recursos económicos (Márquez et al., 2019). En la parroquia Chuquiribamba la crianza de cuyes se realiza en costumbres de crianza castizo que podrían proveer una ventaja a la infección por *Leptospira* spp. en esta especie, sin embargo, las investigaciones en explotaciones cavícolas de América del Sur y Ecuador son escasas.

La leptospirosis es una enfermedad de riesgo laboral asociada en gran parte con la exposición en este caso ha animales domésticos o salvajes y ambientes infectados (Benavides et al., 2021); las personas manifiestan cuadros febriles caracterizados por debilidad, mialgias y cefalea (Yzquierdo, 2017). En el Ecuador, ha generado valor en las autoridades de sanidad, mayormente por el aumento de su incidencia en épocas invernales (Yagual, 2016).

Por lo antes indicado los objetivos planteados en esta investigación fueron los siguientes:

- Identificar el gen *hapI* de *Leptospira* spp. en muestras de orina de cobayos de la parroquia Chuquiribamba del cantón Loja.
- Determinar los tipos de serovares y los títulos serológicos de los cobayos que eliminan *Leptospira* spp. mediante orina.

4. Marco Teórico

“La leptospirosis es una enfermedad de alto contagio que afecta a diversos animales ya sean de tipo doméstico o salvajes los cuales son reservorios de la bacteria que es transmisible al ser humano y es causada por agentes patógenos del género *Leptospira*” (OIE, 2021).

Esta enfermedad zoonótica, se puede adquirir cuando la bacteria entra en contacto con el hospedador quien puede penetrar la piel lesionada o mucosas, a partir de agua contaminada durante la fase de leptospiruria o eliminación de *Leptospira* spp. a través de los desechos biológicos como es la orina de los animales infectados (Bautista T, Bulla C, López B, Díaz A, 2019).

Los animales domésticos son los más predisponentes ya que el microorganismo se mantiene activo, se reproduce y se expulsa en la orina. Además, tienen la capacidad de transmitir la bacteria a sus descendientes durante el periodo de gestación o a través de la placenta. Esto es especialmente común en animales de compañía, y especies mayores como bovinos, porcinos, etc.(Carranza et al., 2020).

La mayoría de los informes sobre leptospirosis en cobayos son estudios experimentales que utilizan esta especie como biomodelo para establecer vías de entrada, lesiones inducidas en órganos diana (hígado, riñón, pulmón) y evaluación de respuestas inmunes tras la inoculación (Ajayi et al., 2021). La susceptibilidad de los cobayos a *Leptospira* aumenta la probabilidad de transmisión a humanos y otras especies animales (Benavides et al., 2021).

4.1 Etiología

4.1.1. Características morfológicas, estructurales y microbiológicas de *Leptospira* spp.

Entre a membrana interna y externa de la *Leptospira*, encontramos el periplasma, donde se observa una pared de peptidoglicano. Esta capa de peptidoglicano es crucial para la forma espiralada de la bacteria y está asociada con proteínas del citoesqueleto. Además, la membrana externa de la *Leptospira* está abundantemente decorada por LPS (lipopolisacáridos) y contiene una amplia variedad de proteínas y lipoproteínas (Figura 1), muchas de las cuales tienen homólogas en bacterias Gram negativas. (Nieves, 2018).

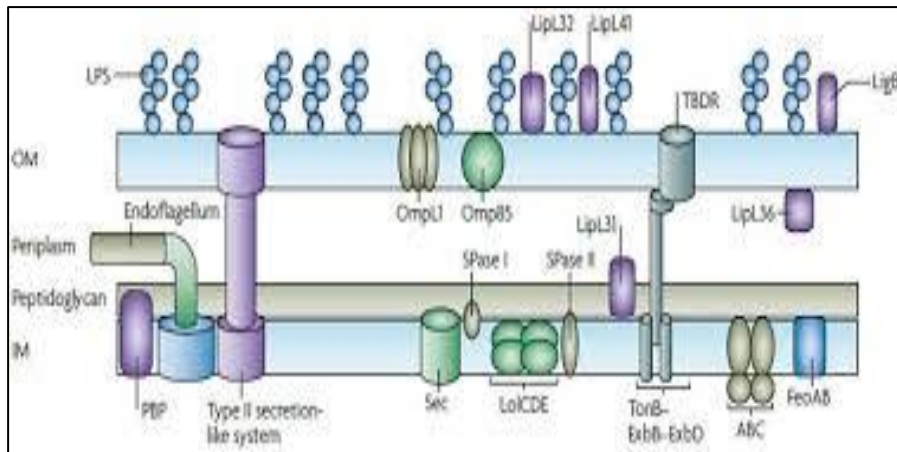


Figura 1. Pared celular de *Leptospira*.
Fuente: Esquema Extraído de Ko et al., (2009)

Las leptospiras son espiroquetas Gram negativas, aerobias, flageladas y móviles. Son bacterias delgadas en forma de gancho. Su diámetro es de 0,1µm y su longitud de 5 a 20µm. Las especies patógenas separadas de un huésped tienden a ser más cortas y firmemente enrolladas que las cepas (Martin, 2018).

Posee un cilindro protoplasmático que le da facultad para moverse por el organismo infectado, por lo cual presenta un antígeno somático siendo el causante de la inmunidad protectora (Romero-Vivas & Falconar, 2016).

Tienen un movimiento giratorio gracias a filamentos axiales dentro de su cuerpo periplásmico. Esta característica resulta importante para su patogenicidad, por su tamaño ya que son muy delgadas, no son visibles al microscopio de luz convencional (Luján et al., 2019), las leptospiras se observan (Figura 2) con apoyo del microscopio de campo oscuro se pueden teñir con técnicas de inmunodetección e impregnación argéntica, se colorean bajamente con colorantes de anilina (García et al., 2013).

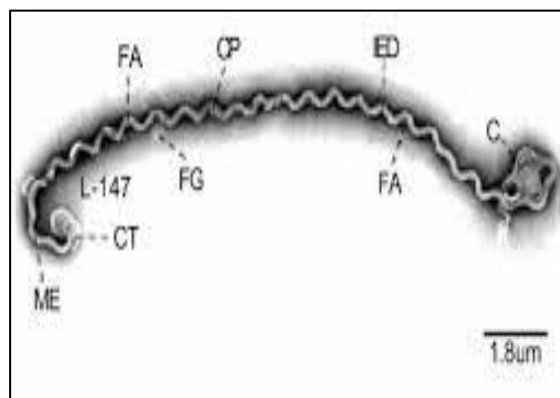


Figura 2. Estudio Ultraestructural de *Leptospira*.
Fuente: Extraído de Macedo A., (2005)

Se desarrollan a una temperatura estable entre 28-30°C y en un hábitat con pH que está entre 7.2 y 7.6. Siendo que las especies de origen saprofítico son propias en el medio ambiente sin infectar a un animal huésped (Le Turnier & Epelboin, 2019). Es sensible al calor, frío y variaciones de pH (García et al., 2013). Si el pH de la orina es ácido, la *Leptospira* en ella desaparecerá en poco tiempo. “Las leptospiras viven en la orina con un pH ligeramente alcalino, como por ejemplo en la de los animales domésticos, donde pueden sobrevivir durante períodos de tiempo variables” (Dangond, 2015).

Para sobrevivir al entorno que lo rodea depende de una gran humedad del suelo, con ayuda de una elevada temperatura aproximadamente de 250 °C y la presencia de materia orgánica. La orina de los animales herbívoros es la principal fuente de contagio ya que tiene un pH alcalino, creando un ambiente de supervivencia de la bacteria (Adler & De la Peña, 2010); en condiciones naturales, las leptospiras permanecen vivas durante varias horas en la leche materna de animales lactantes en etapa septicémica (Ellis et al., 1991).

4.2. Clasificación de *Leptospira* spp.

En el pasado, el género *Leptospira* se clasificaba en dos especies: *L. interrogans* y *L. biflexa*. El primero incluía todas las cepas que causan enfermedades, mientras que el segundo comprendía las saprófitas. Estos dos grupos se subdividían en varios serovares basados en la aglutinación después de la absorción cruzada con varios antígenos homólogos, utilizando la técnica CAAT (Adler, 2015).

“Mediante tecnologías de secuenciación masiva, esta separación en dos especies se fue complejizando”. El género *Leptospira* para el año 2018 se encontró un total de 35 especies y para el 2019 un total de 65 especies, las cuales se las denominó en su mayoría ambientales (Thibeaux et al., 2018). “Entre las más comunes encontramos dentro de las especies patógenas: *L. noguchii*, *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. alexanderi*; en las especies intermedias: *L. wolffii*, *L. broomi*, *L. licerasiae*, *L. venezuelensis*; en las especies saprofitas: *L. idonii*, *L. macculloughii*, *L. meyeri*, *L. biflexa*” (Picardeau, 2017).

Con el uso de diversas técnicas sobre el genoma en años actuales, se ha establecido que *Leptospira* spp se clasifica en tres linajes: patogénico, intermedio, saprofítico (Abdullah et al., 2021); que se correlacionan con el nivel de patogenicidad, dentro de los cuales se agrupan muchos serovares incluido en serogrupos (Caimi & Ruybal, 2020).

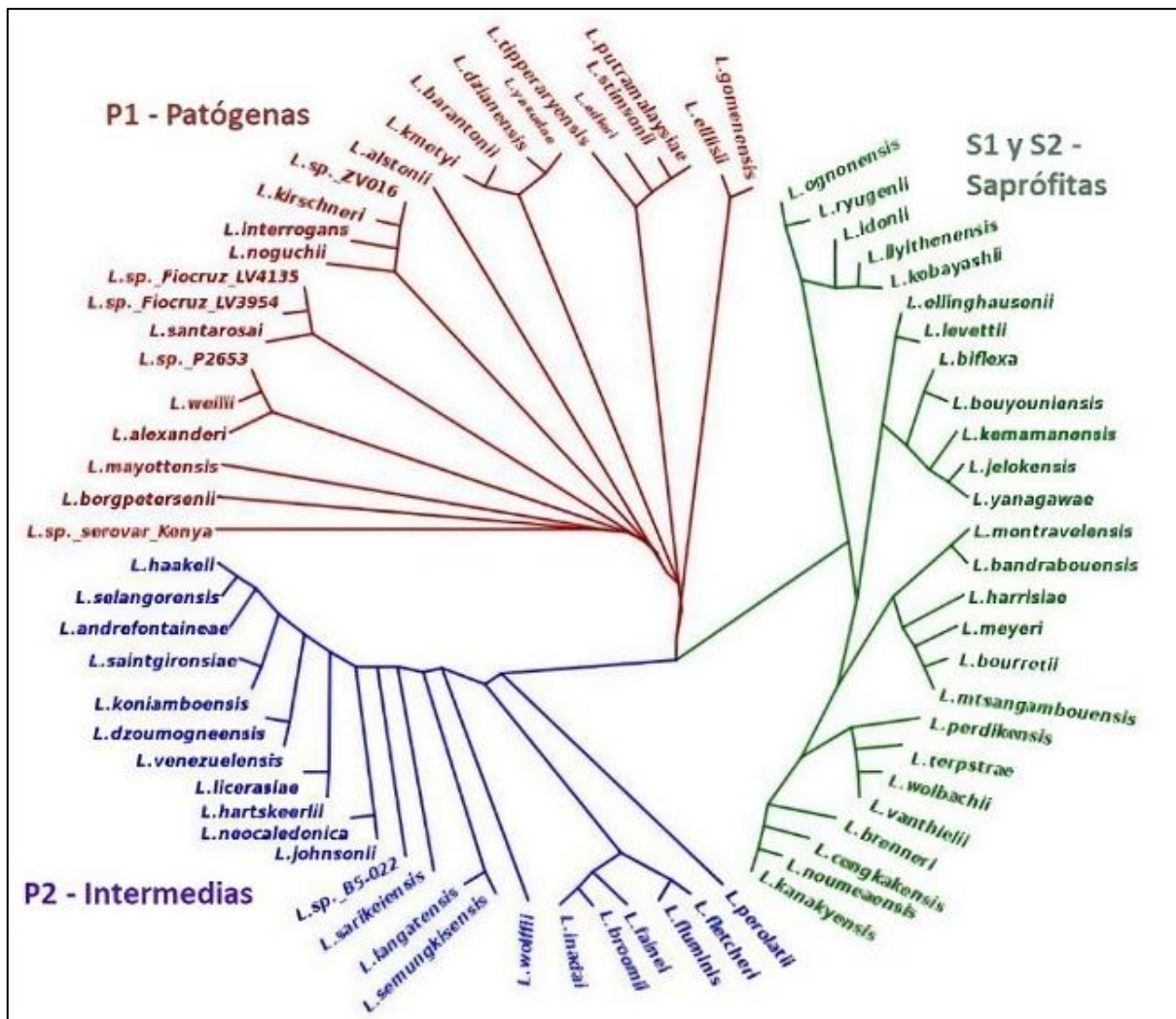


Figura 3. Filogenia del género *Leptospira*.
Fuente: Tomado y modificado de Abdullah et al., (2021)

4.2.1. Clasificación taxonómica

Las leptospiras se asocian dentro del Orden:

“División Procariotes, Orden Spirochaetale, Clase Schizomicetes, Familia Leptospiraceae, Género *Leptospira*” (Levett, 2015).

4.2.2. Clasificación fenotípica

Hasta los 80 este género comprendía las especies *L. interrogans* y *L. biflexa*, que se asociaban en cepas patógenas aisladas de mamíferos y cepas saprófitas, separadas de aguas frescas y suelos húmedos (Brenner et al., 1999). *Leptospira* comprende 21 especies en dos grupos: el grupo infeccioso, dividido en Grupo I con 9 especies patógenas y Grupo II con 5 especies patógenas denominadas intermedias y por último el grupo no infeccioso, en el que se encuentran las no patógenas o saprófitas con 6 especies, incluyendo la nueva especie *L. idonii*

(Saito et al., 2013). Adicionalmente, *L. meyeri*, compuesta por serovares patógenos y saprófitos (Ahmed, & P. Grobusch, 2012).

En la (Tabla 1) se ve la clasificación de grupos, especies, serogrupos /serovariedades de *Leptospira*.

Tabla 1. Clasificación de serogrupos/serovariedades de *Leptospira* spp

GRUPO 1: Especies Patógenicas					
Especies	serogrupo	Serovariedad	Especie	serogrupo	Serovariedad; cepas
	Manaho	Manaho3 (L60T)			Grippotiphosa (andaman)
<i>L. alexanderi</i>	Hebdomadis	Manzuhang (A23)		Grippotiphosa	Copenhageni (M20)
<i>L. alstonii</i>	Ranarum	Pinchang. (80-412)	<i>L. interrogans</i>		copenhageni/ictero (I15)
	Hebdomadis	Jules(jules)		Autumnalis	Bulgarica (Nicolaevo)
	Javanica	Javanic (Veldrat) Batavia		Grippotiphosa Icterohaemorrhagie Pomon	Grippotiphosa (DF)
			<i>L. Kirschneri</i>		
	Sejroe	Hardjo(K-125) Sejroe (M 84)			
	Tarassovi	Guidae (RP29)			
<i>L.borgpetersenii</i>	Australis	Australis(Ballic)			
		Bangkok (Bangkok D-92)			
		Lora (lora)	<i>L. noguchii</i>	Louisiana	Louisiana (LSU1945)
	Autumnalis	Autmnalis (Akiyami A) Bulga(Mallika)		Panam	Panama (CZ 214 K)
				Tarassov	Bac 1376 (Bac1376)
	Bataviae	Bataviae		Autumna	Alice Bataviae (Schoolby)
	Mini Pomona	pomona (No designada)			
<i>L. interrogans</i>					
			<i>L. weilli</i>	Celledoni	Celledoni (Celledoni)

	Canicola	Canicola		Javanica	Coxi (Cox)
		Galtoni (LT 1014)		Sarmin	Sarmin
		Portlandvere (My 1039)			
	GRUPO 2: Especies patógenas intermedias			GRUPO: De especies saprofiticas	
			<i>L. biflexa</i>	Sermanaga	Patoc 1
<i>L. fainei</i>	Hurstbridge	Hurstbridge	<i>L. trepstrae</i>	Icterohemorragia e	Hualin
<i>L. liserasiae</i>	No designado	Varillal	<i>L. vanthiell i</i>	Holland	Holland
<i>L. wolfi</i>	No designado	No designado	<i>L. wolbachii</i>	Codice	Codice
			<i>L. yanagawae</i>	Semaranga	Saopaulo
			<i>L. idoni</i>		

Fuente: Tabla adaptada de Romero-Vivas & Falconar (2016)

4.2.3. Clasificación genotípica

“El género *Leptospira* ha experimentado una reorganización y ahora se cree que comprende 66 especies que se pueden agrupar en cuatro subclados. Las espiroquetas que causan enfermedades dentro del género *Leptospira* se encuentran principalmente en el subclado P1” (Casanovas et al., 2020).

Los dos clados se subdividen en dos subclados cada uno los dos clados principales son: "Saprofitos" que contienen especies aisladas en el ambiente natural y que no son responsables de infecciones y "Patógenos". Los dos clados se subdividen en dos subclados cada uno: Clados P y S y subclade P1 (como el grupo patógeno), P2 (como el grupo intermedio), S1 (como el grupo saprofito) y S2 (el nuevo subclado que incluye *L. Idonii* (Vicente et al., 2019)

Mediante genética el subclado P1 y P2, son iguales a todo el clado S. Como *L. licerasiae*, perteneciente a P2, *L. interrogans* perteneciente a P1, *L. borgpetersenii*, también corresponden al subclado P1 (Ricaldi et al., 2012).

Ensayos moleculares para *Leptospira* spp. se han desarrollado, dirigidos a genes de mantenimiento como *gyrB*, *rrs* (16SrRNA) y *secY*, o *lipL32*, *ligA* y *ligB* específicos de patógenos, que evitan la amplificación de genes no patógenos (Woods et al., 2018).

4.2.4. Clasificación serológica

La prueba que da lugar a los serovares, que se consideran hoy en día como la unidad sistemática básica para *Leptospira* spp. Dos cepas se consideran distintas si, después de la absorción cruzada con cantidades apropiadas de antígenos heterólogos, al menos el 10% del

título heterólogo permanece consistentemente asociado con uno de los seis antisueros (Cerqueira & Picardeau, 2009). La estructura de los (LPS) es el principal factor del serovar (Galloway & Levett, 2010; Picardeau, 2013).

La categorización de los serovares se realiza mediante la prueba serológica de Aglutinación-absorción cruzada. Aquellos serovares que son homólogos en términos antigénicos se agrupan en serogrupos. Aunque el serogrupo no tiene relevancia taxonómica, ha probado ser valioso para el diagnóstico serológico y para entender la epidemiología a nivel regional o poblacional. (Levett, 2015).

4.3. Transmisión

La propagación de la enfermedad está condicionada por la existencia de portadores que no presentan síntomas (como roedores, cánidos y ganado) en áreas con climas húmedos tropicales y subtropicales. La transmisión ocurre cuando las mucosas o heridas en la piel entran en contacto directo con orina, sangre, agua o suelo contaminados con *Leptospira* spp. (Serrano-Martínez et al., 2020).

La infección en humanos sucede de forma no intencional laboral, recreativas o a causa de desastres naturales. En estos casos, las aguas estancadas y contaminadas se convierten en un foco de contagio potente de *Leptospira*, que se mantiene viva e infecciosa en diversos ambientes como suelo húmedo, agua estancada y barro en gran parte la bacteria penetra gran parte del organismo por medio de heridas, piel húmeda, vía oral y tiene libre acceso a el torrente sanguíneos y que viaje a otros órganos(Valverde-latorre et al., 2021).

La *Leptospira* transmitida por cobayas pueden conducir y diseminar las bacterias, especialmente si permanecen en condiciones favorables en las que entran en contacto con ratas y roedores salvajes infectadas; las principalmente la fuente de infección para estas especies lo constituye la orina de animales infectados, agua, leche, forrajes, tejidos de animales, descargas postparto y semen contaminado (Saul, 2019)

Los roedores suelen contraer leptospirosis a una edad temprana y la sostienen como una infección persistente en los túbulos renales, liberando bacterias en su orina durante toda su vida, en hasta el 10% de los casos. Esto se debe a que la orina de estos animales es alcalina, lo que proporciona un entorno adecuado para el crecimiento de la bacteria. Los roedores pueden transmitir la bacteria a sus crías durante el periodo de gestación o a través de la placenta. Además, el contagio puede ocurrir de forma directa ya sea por contacto sexual, por orina o

por otros medios directos, como mordeduras, fuentes ambientales contaminadas con bacterias (Minter, et al ., 2017).

“Los animales que sufren que se encuentran en la fase crónica logran convertirse en portadores para toda la vida y actuar como formas de infección para distintos animales y seres humanos. Es importante tener en cuenta el diagnóstico diferencial basado en las manifestaciones típicas en diversas especies” (SENASA, 2016).

Los roedores, con su habilidad para moverse por diversos lugares, son considerados los vectores más significativos y representan un desafío para la salud pública en varias regiones geográficas. Generalmente, liberan bacterias al ambiente a través de su orina después de un período de cinco a catorce días. Cada serovar está asociado con enfermedades secundarias debido al daño sistémico causado en el cuerpo (Bautista et al., 2019).

Dentro de los mecanismos más frecuentes de transmisión se presenta el saneamiento deficiente, control de roedores deficiente y sistemas mixtos de manejo de animales, humedad alta del suelo, cambios de clima (Ellis, 2015).

4.4. Patogenia

La forma helicoidal de la bacteria como la motilidad y ciertas enzimas que degradan la dermis como el colágeno, elastinas y fibronectinas, abriendo paso por el tejido conectivo a gran velocidad (Días, 2019).

“Las leptospiras cuentan con propiedades combativas, su motilidad y, el efecto de enzimas del tipo fosfolipasas. Se ha proyectado que la glicoproteína bacteriana actúa como endotoxina en la membrana celular, provocando apoptosis. Es la puerta de entrada a la inflamación de los vasos sanguíneos, principalmente de los pequeños” (Zunino Martini & Pizarro P., 2007).

Una investigación realizada por Lemus y colaboradores (2017) demostró que la rata portadora de la bacteria también sufre daño. La espiroqueta, después de penetrar la mucosa o la solución de continuidad de la piel, se disemina por el flujo sanguíneo y produce una vasculitis infecciosa, ocasionando alteraciones principales de la enfermedad en órganos como son: hígado, riñones, pulmones, cerebro y meninges; corazón, músculos, ojos, así como desviación del líquido intravascular al extravascular (Monzon Tamargo & María de Jesús, 2019).

La infección causa una leptospiremia prolongada, alcanza diferentes órganos importantes: hígado, riñón, corazón e inclusive sistema nervioso central y humor acuoso, que termina cuando el hospedero produce una respuesta inmune que ocurre entre una a dos semanas después de la exposición. Los procesos infecciosos por Leptospirosis cursan con síntomas asintomáticos y autolimitados en un periodo de 4-7 días (García et al., 2013) .

Al igual que otras bacterias Gram negativas, se observó que los anticuerpos producidos durante el proceso de leptospirosis se aglutinan, logrando que la respuesta inmune producida luego de una infección dependerá de si el alojador es reservorio o puede ser accidental (Nagel et al., 2019).

La respuesta inmune humoral cada vez va orientada contra la parte lateral del LPS; los LPS originan la creación de anticuerpos de tipo IgM e IgG. Después de la opsonización y la fagocitosis, las espiroquetas se eliminan por el sistema reticuloendotelial; la celeridad de la depuración de las leptospiras es de consideración pronóstica (Sanchez Arturo, 2011).

Luego de la infección se producen inmunoglobulinas IgM e IgG específicas, que evitan síntomas clínicos post-exposición (Adler & De la Peña, 2010). La IgG también aparece, en índices más altos a las 4 semanas post-infección y persisten por largos periodos (Ballard et al., 1984).

En el proceso de leptospiuria, se pueden encontrar los niveles de inmunoglobulinaM no se encuentran en sangre. Por el contrario, se puede detectar las IgG en orina, a las 6 semanas después de la infección. Los animales suelen presentar una respuesta inmune local, apareciendo IgA en la orina, hacia las 12 semanas de la infección. Esta presencia de ambas, tiene un efecto negativo sobre la variabilidad de las leptospiras en ésta, tal y como lo demostraron (Sandow & Ramírez, 2005).

4.5. Manifestaciones clínicas

A pesar de que la leptospirosis clásica se describe como una enfermedad bifásica suele ser monofásica y esta puede evolucionar de forma leve, es decir con pequeñas manifestaciones clínicas en un periodo corto o pasar desapercibida, aunque en las formas graves ambas fases suelen fundirse en una sola (Valverde-latorre et al., 2021).

“En el ser humano, después de los síntomas inespecíficos, se puede presentar una de las dos formas, la menos crónica, se denomina forma anictérica, en la que hay una fase de

leptospirosis; Comienza con fiebre alta de 39- 40°C, cefalea, pérdida de apetito, náuseas, vómitos, diarrea y síntomas respiratorios. La enfermedad febril comienza con síntomas inespecíficos: dolor de cabeza, escalofríos, vómitos, dolores musculares fuertes, infección en la membrana externa del ojo, que dura aproximadamente de 5 a 10 días, por sus síntomas inespecíficos logran confundirse con otras enfermedades” (Bautista et al., 2019).

En animales domésticos la enfermedad se manifiesta principalmente como problemas renales y reproductivos. Por ejemplo, en los cerdos se presentan signos como aborto, nacimiento de un número reducido de crías, debilidad e infertilidad temporal, pero generalmente son asintomáticos y su forma depende de factores como la bioseguridad dentro de los lugares de producción (Ospina et al., 2017).

En bovinos se presenta por fiebre progresiva alta, de rápida de glóbulos rojos, ictericia, dificultad para respirar, pérdida total del apetito y síndrome urémico. Acaba con la muerte del animal agonizando hasta 5 días, siendo los terneros los más afectados; en hembras produce aborto por la fiebre alta y la desaparición de la producción de leche (síndrome de la caída de la leche (Castillo, 2014).

En perros encontramos un proceso de debilidad, un estado mental alterado, letargia, adelgazamiento apresurado y progresivo del 50% de su masa corporal, puede presentar temperatura o un proceso de hipotermia, edema corneal, conjuntivitis, úlceras en las encías (Luna et al., 2008).

Los signos en cobayos inoculados con leptospiras por vía intraperitoneal incluyen ictericia, conjuntivitis, inapetencia, anemia, hemorragias, y albuminuria. (Adler & De la Peña, 2015). Producen abortos, muerte perinatal, crías débiles e infertilidad (Hamer et al., 2019). En un estudio experimental realizado por Lourdault en el año (2009) menciona que los cuyes infectados con *Leptospira* exhibieron niveles normales de aspartato amino transferasa, bilirrubina, urea, creatinina y fosfatasa alcalina en los primeros 5 días post-infección comparados con animales de control. Dentro del rango de los 6 a 7 días, gran parte de la función renal de los animales contagiados exhibió índices aumentados de urea y creatinina, al igual que las demás enzimas (Lourdault et al., 2009).

4.6. Lesiones

En cuyes inoculados con *Leptospira* se ha reportado lesiones graves como hemorragias en los pulmones, nefritis, ictericia, hematuria, etc. (Zhang et al., 2012).

En un estudio realizado en el año 2013 por Valverde para Journal of Medical Microbiology sobre la morfometría cardíaca y pulmonar realizada en ratas Wistar inoculadas con *Leptospira* demuestra la disminución del peso y volumen del corazón en ratas que a pesar de que es portadora de leptospirosis también sufren daños como es la disminución del volumen total de sangre que circula por el organismo, se presenta disfunción renal y provoca la muerte por hemorragia en mucosas, piel y serosas superficiales, con insuficiencia multiorgánica aguda, e incluso hemorragia pulmonar (Valverde et al., 2013).

Se demostró la presencia de antígenos leptospirales en la luz y adheridos a las paredes de los vasos miocárdicos, lo que reafirmó la idea de que los microorganismos lesionarían directamente las células endoteliales, provocando anoxia y muerte de las fibras miocárdicas leptospirales. En cuanto al peso cardíaco, se observó una ligera disminución, lo que se relaciona con el efecto vascular que producen las leptospiras, por lo que se producen hemorragias pericárdicas y endocárdicas en el corazón (Monzon, 2019).

Un estudio experimental en ratas Wistar gestadas demostró cambios en el útero, los ovarios y las trompas de Falopio. La mayoría de las lesiones ocurrieron en el útero, con igual número de lesiones en los ovarios y las trompas de Falopio. Se visualizaron quistes de ovario en el 36,11% de las muestras. La leptospirosis infecta los genitales internos, causa una variedad de lesiones y prevalece en los trastornos congestivos y hemorrágicos (Mosquera, 2022).

4.7. Diagnóstico

Los métodos de diagnóstico convencionales incluyen cultivo microbiológico, y los indirectos de ELISA y el Test de MAT. En tanto que los métodos de actuales de diagnóstico se basan de lleno en la Reacción en Cadena de la Polimeras y sus variantes (Días, 2019).

4.7.1. Método de MAT

Es una técnica de referencia para el diagnóstico serológico de la leptospirosis por su alta sensibilidad y especificidad, por lo cual puede relacionar el serovar o serogrupo de *Leptospira*

comprometida en la infección. El Test de Aglutinación Microscópica es la prueba para el diagnóstico de la enfermedad de *Leptospira* spp y es el método más usado para la detección de anticuerpos en suero de animales (Khalili et al., 2014). Esta prueba se logra incubando el suero del paciente con un conjunto variado de serovares de *Leptospira* (Chirathaworn et al., 2014).

El MAT se considera la prueba inmunológica de referencia y detecta anticuerpos aglutinantes IgM e IgG. Esta prueba requiere de una gran experiencia técnica y el mantenimiento de cultivos estándar vivos de *Leptospira* patógena (Niloofa et al., 2015). MAT es de importancia para la vigilancia epidemiológica basada en serogrupos y se restringe a laboratorios de referencia (Marquez et al., 2017).

4.8. Reacción en Cadena de la Polimerasa para diagnóstico de leptospirosis

La PCR, una técnica versátil debido a sus diseños y toma de muestras que se pueden manejar, ha logrado grandes resultados en los protocolos de diagnóstico. Su excelencia consiste en que nos permite reconocer el ADN aunque las bacterias no son viables (Oliveira et al., 2010).

Las PCR son sensibles, pero el proceso realizado de control de calidad y el procesamiento de las muestras son cruciales y deben adecuarse al tejido, al líquido y a la especie que se esté analizando; al igual que ocurre con las pruebas inmunoquímicas no se identifica el serotipo infectante, aunque algunos identifican la especie (OIE, 2021).

La PCR, amplifica el ADN de manera específica con una alta sensibilidad y en un periodo de tiempo bajo en cualquier material clínico; como es la confirmación rápida de la enfermedad y la localización del ADN. Esta es una técnica muy sensible y se emplea cada vez más para detectar la bacteria en líquidos corporales de animales debido a su especificidad y a la capacidad de dar un diagnóstico temprano y seguro (Martínez, 2018).

Hasta la fecha varios protocolos de PCR punto final y en tiempo real han sido publicados para el diagnóstico de leptospirosis en las distintas especies animales. Las diferencias entre ellos se basan principalmente en los cebadores y las muestras clínicas utilizadas en los resultados de sensibilidad y especificidad, es decir, que la sensibilidad se refiere a la capacidad de un test para detectar verdaderos positivos, mientras que la

especificidad se relaciona con la capacidad de identificar verdaderos negativos (Martin et al., 2015).

A continuación algunos estudios que demuestran la detección del gen hap1 en muestras de Orina de bovinos con técnica de PCR punto final (Léon et al., 2006); muestras en sangre y orina de caninos con técnica de sonda Southern (Branger et al., 2005); Muestra en Orina bovinos con técnica de Punto final (Nossa, 2017); muestras en orina de bovinos inoculadas experimentalmente con técnica de PCR extracción Chelex-100 (Revelo et al., 2020).

4.9. Tratamiento

La terapéutica con la línea de antibióticos durante la infección crónica puede reducir el estado del portador, siendo que el tratamiento es mucho más útil cuando el animal contagiado es tratado durante la fase de leptospiremia (Martínez, 2018).

“Los antimicrobianos más utilizados en medicina veterinaria son la dihidroestreptomicina, penicilina, ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas de tercera generación. El antibiótico de elección para el tratamiento del cuadro agudo en bovinos es la combinación de penicilina y estreptomicina la cual remueve parcialmente las leptospiras de los riñones del animal portador, quedando significativamente remanentes de bacterias en el animal” (Spickler & Leedom, 2015).

En animales con casos crónicos y fallas en la reproducción la estreptomicina es una gran opción. En los casos agudos son tratados con una combinación de estreptomicina y penicilina (Correia et al., 2019). Además, se ha descrito la efectividad del uso de amoxicilina, tetraciclinas y cefalosporinas de tercera generación para el tratamiento de leptospirosis animal (Koizumi & Picardeau, 2020).

4.10. Prevención

Según OIE, (2021) las vacunas para *Leptospira* animal son suspensiones de algunas cepas patógenas de la bacteria inactivada que se conserva la actividad inmunógeno. La investigación en el área de las vacunas ha tenido grandes avances y se ha abordado distintos tipos de formulaciones. Según la OIE, (2021), “ Por medio de la vacunación creamos la inmunidad inducida. Las cuales contienen serotipos y preferentemente aquellos genotipos que causen preocupación y transmisión en la especie animal o de una especie a otra en la región” (OIE, 2021).

4.11. Epidemiología

“Cualquier *Leptospira* puede infectar a una especie animal, pero una pequeña cantidad de serotipos serán propio y exclusivo de la región, debido a que la leptospirosis es una enfermedad que presenta una habilidad natural de mantener un foco dinámico y circulante. Por lo tanto, en cualquier región una especie animal doméstica resultará infectada por serotipos mantenidos por una especie presentes en la zona” y mantenerse en huéspedes específicos (OIE, 2021).

En el departamento de Cajamarca, Perú, se encontraron casos de leptospirosis en humanos con mayor producción de cuyes en el país (Ministry of Health of Peru, 2006), la tasa de *Leptospira* en cuyes es de 16.53%. La incidencia de *Leptospira* en cuyes comerciales en Lima y Junín es de 30.6 y 38.4%, respectivamente (Gutiérrez & Morales, 2020).

La leptospirosis con mayor distribución alrededor del mundo y con mayor impacto. Según estudios poblaciones cada año se presentan más de 350 000 casos nuevos de leptospirosis, pero en la realidad solo se notifican menos de los que en realidad ocurren. La mortalidad a nivel mundial es de 6.85% (Carranza et al., 2020).

Esta enfermedad es considerada una antropozoonosis, que afecta tanto a los animales domésticos y de sangre fría y consecuentemente a humanos. Es una enfermedad con altas prevalencias, contingencia de transmisión, por tal razón se encuentra entre las 35 causas de mortalidad a nivel mundial y grandes pérdidas económicas. La enfermedad presenta una cierta estacionalidad, especialmente en verano en países templados y en épocas de lluvia en países cálidos. (A.M.S.E., 2016).

En Ecuador la enfermedad, tiene una media anual de 1 caso por 100.000 habitantes, por ello en los años 2016 al 2018 se han confirmado 363 casos, con predominio en las provincias de la costa con un porcentaje de 43% de casos de leptospirosis. Permitiendo una comparación con los casos anteriormente presentados entre el año 2020 se notificaron 137 casos, en el año 2021 se notificaron 69 casos de transmisión. En la semana 51 del consiguiente año 2022 se notificaron 134 casos de *Leptospira* a nivel nacional. En el año 2023 hasta la SE 10 se han reportado 2 personas fallecidas. Actualmente en el año 2024 hasta la SE 20 con un total de 331 casos se reportó una persona fallecida de sexo femenino en Santo Domingo de los Tsachilas, siendo así que entre las siguientes provincias con casos confirmados tenemos: (Guayas 176 casos, en Manabí 53 casos, en Santo Domingo de los Tsáchilas 25 casos, en Pichincha 10 casos, en Napo con 4 casos, Sucumbíos 1 caso, Azuay con 1 caso, Zamora Chinchipe con 5 casos y Morona Santiago con 20 casos (MSP, 2023).

5. Metodología

5.1. Localización del estudio

La presente investigación tuvo lugar en la parroquia de Chuquiribamba de la provincia de Loja, cantón Loja a una altitud que oscila entre los 2.723 m.s.n.m, con una temperatura promedio de 12.5 ° C, con precipitaciones anuales que fluctúan entre 700 y 2000 milímetros(Balcázar, 2016).

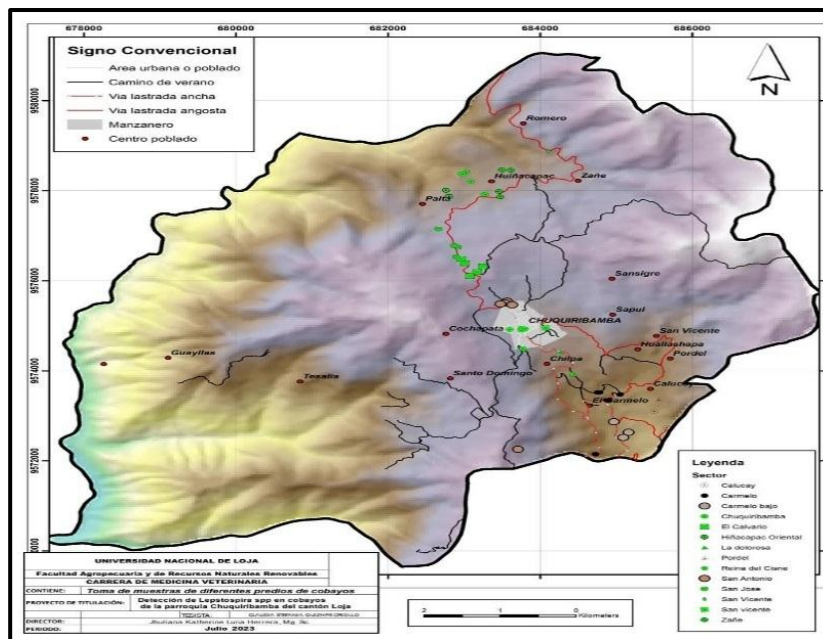


Figura 4. Mapa de la parroquia de Chuquiribamba
Fuente: Centro de Investigaciones Territoriales (2023)

5.2. Diseño del estudio

El presente es un estudio transversal de tipo observacional que se hizo en 2 fases: una de campo en donde se realizó el muestreo de los animales para recolectar muestras de orina y sangre, y el levantamiento de información; y una fase de laboratorio para la detección de *Leptospira* patógena y de anticuerpos mediante serología.

5.3. Tipo de muestreo de animales y tamaño de muestra

Debido a que no se disponía de un registro de los productores de cobayos en la parroquia (marco muestral) se empleó un muestreo no probabilístico, en el que participaron los productores que voluntariamente decidieron colaborar luego de haber socializado el propósito de la investigación. Se muestrearon 85 cobayos de 50 predios del sistema de crianza

familiar o familiar-comercial, de acuerdo al tamaño del predio en función del número de animales, tal como se detalla a continuación:

Tabla 2. Número de animales muestreados, de acuerdo al tamaño del predio

Tamaño de la UPA	Predios de producción	Cantidad de cuyes
1 - 50 cuyes	25	25
50 - 100 cuyes	11	30
101 - 200 cuyes	11	22
201 - 300 cuyes	0	0
251 - 350 cuyes	3	8
Total	50	85

5.4. Transporte, identificación de los animales y registro de información individual

La adquisición de animales se realizó entre marzo y abril del año 2022. los animales fueron transportados respetando los principios de bienestar animal como la densidad de los animales en la caja, ventilación, etc. Al llegar a la Universidad Nacional de Loja se procedió a suministrar forraje la cantidad necesaria para que pasaran la noche y así al día siguiente ser llevados a la sala de necropsias de la Carrera de Medicina Veterinaria.

Una vez que los cobayos pasaron al área de necropsias, se evaluó cada animal en función del peso y características de edad y sexo; y se asignó un código único con fines de organización de la información.

5.6. Eutanasia y necropsia

Para la eutanasia se procedió a realizar el procedimiento por concusión, método realizado para el aturdimiento de roedores de menos de 1 kg (Close et al., 1997). Para realizar este proceso se procedió a sujetar al animal de sus extremidades inferiores de tal manera que su cabeza quede boca abajo, luego se generó un golpe certero en el cráneo del mismo con un objeto macizo, tras corroborarse la muerte del animal se realizó la necropsia del animal siguiéndose el procedimiento recomendado por Gagea & Craig (2012), con el fin de tomar muestras de sangre por punción cardiaca y de orina por cistocentesis.

5.7. Protocolos de bioseguridad para obtención de muestras y laboratorio

El equipo de investigadores hizo uso de delantal, mascarilla y guantes de látex, estos últimos era cambiados en cada de toma de muestras para evitar contaminaciones. Todas las muestras fueron rotuladas y colocadas dentro de una nevera térmica con gel refrigerante a una temperatura de -4°C ; hasta su envío al Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja, en un lapso máximo de 3 horas.

5.8. Toma y conservación de muestras

Mediante la técnica cistocentesis, se procedió a tomar una muestra de orina en cantidad de 3 ml para luego ser colocada en tubos eppendorf; por otra parte, las muestras de sangre se colectaron por punción cardiaca en una cantidad promedio de 3 a 5 ml de sangre en tubos vacutainer sin anticoagulante, las mismas que luego fueron centrifugadas a 1500g revoluciones por minuto en un tiempo de 10 minutos para la obtención de suero.

Las muestras de suero y orina fueron almacenadas a una temperatura de -20°C hasta que fueron enviadas a la Universidad Técnica de Manabí. para el diagnóstico por MAT y PCR convencional, respectivamente.

5.9. Detección de *Leptospira* patógena mediante PCR convencional a partir de muestras de orina

Las muestras se sometieron a un proceso de estabilización y concentración en laboratorio según el protocolo establecido por (Stoddard, 2013) que incluyó lavado con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y, una vez estabilizada la muestra, se almacenó a -20°C .

Las muestras de orina estabilizadas con PBS se sometieron al protocolo de extracción descrito por (Matamala, 2018) utilizando 500 μl de tampón de lisis que contenía EDTA, SDS, TRIS y CINA y 5 μl de proteinasa K y se incubaron. 1 hora a 56°C con bloque térmico, tras lo cual se añadió etanol al 100% para precipitar el ADN.

El material genético obtenido a partir de las muestras de orina fue analizado mediante PCR convencional para determinar la presencia o ausencia del gen *hap1* de 262 pb, perteneciente a *Leptospira* patógena (reverse primer “TGTTGGGGAAATCATACGAAC”; forward primer “GCAAGCATTACCGCTTGTGG” (Branger et al., 2005).

5.9.1. Replicación del ADN

La amplificación de PCR consistió en un ciclo inicial de 5 min a 95°C seguida de 45 ciclos de 15 seg a 94°C, 35 seg a 56°C y 40 seg a 72°C; la extensión final fue realizada durante 10 min a 72°C.

5.9.2. Electroforesis y lectura en gel de agarosa

Los productos de PCR fueron cargados en gel de agarosa al 1,5% teñido con SYBR Safe y cargados con Buffer de carga 6X y sometidos a 100 Voltios por 40 minutos.

Cada muestra fue colocada en los pocillos de gel de agarosa, en este se agregó una muestra de control positivo con ADN de *Leptospira* y un patrón de peso molecular con 262 pares de bases. Luego se colocó a la electroforesis a la corriente eléctrica hasta que el colorante del buffer migre lo suficiente del polo negativo al polo positivo. Se apaga la fuente eléctrica y se colocó el gel sobre un transiluminador de luz UV, para calcular la altura a la que corrieron las bandas de ADN.

Para continuar con la lectura se comparó lo siguiente: La banda de patrón de peso molecular con las bandas del ADN de las muestras.

5.10. Diagnóstico serológico mediante MAT (aglutinación microscópica)

El suero sanguíneo se sometió a un análisis mediante (MAT), se usó un panel de siete serovares de *Leptospira interrogans* (Sejroe, Canicola, Hardjo, Bataviac, Wolffii, Pomona) y *Leptospira borgpetersenii* (Tarassovi). Se consideraron muestras positivas aquellas que presentaron aglutinación en un punto de corte de 1/50 y se realizaron diluciones dobles hasta una titulación de 1/1600. La observación de la reacción de aglutinación se realizó en microscopio de campo oscuro y en caso de coaglutinaciones se había considerado tomar como positivo el serovar con la titulación más alta (OIE, 2021).

6. Resultados

6.1. Resultados de la identificación del gen *hap1*

Por la técnica de PCR convencional se observó la presencia de *Leptospira* spp. en dos animales a partir del análisis de las muestras de orina (Figura 5).

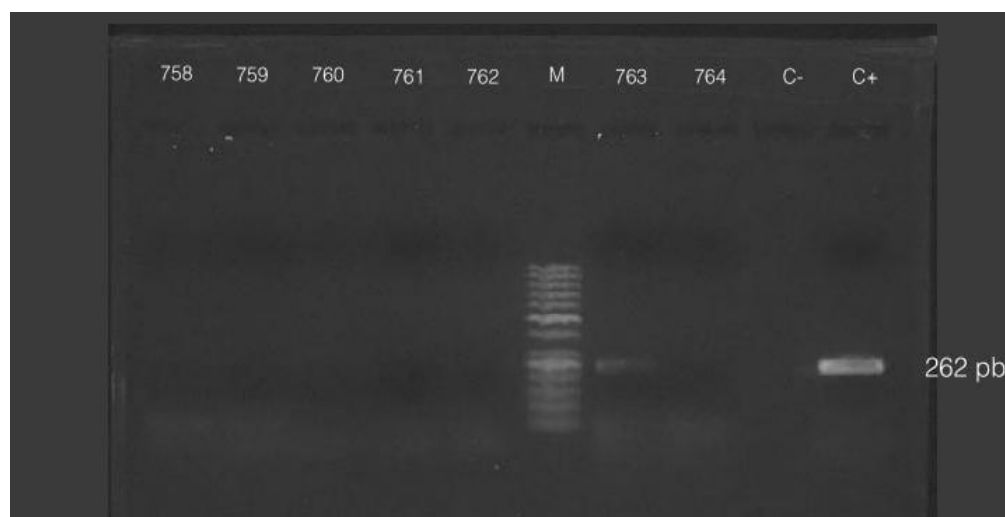


Figura 5. Resultado de electroforesis de detección molecular de *Leptospira* spp.

Se observa detección de gel de agarosa en la amplificación de un cobayo infectado con *Lepstopira*. La banda corresponde a un fragmento del gen *hap1*. Se utilizó marcador de peso molecular de 262 pb. Además, en todas las reacciones se utilizó un control positivo(C+) y un control negativo (C-) para todas las reacciones.

Se determinaron 2 animales positivos a PCR (2,35%) siendo uno de estos positivo para MAT.

Se determinó que el primer caso positivo en el diagnóstico molecular era una hembra de 8 semanas de edad con un peso correspondiente de 444.5g. A este animal se lo obtuvo del sector Zañe de la parroquia Chuquiribamba, en este predio su sistema de crianza era familiar, su manejo o instalaciones consistía en pozas en la cual no se detectó presencia de abortos; en cuanto a su alimentación se empleaba una dieta basaba en forrajes, no se les suministraba agua y tenían cercanía con otros animales como perros y gatos. Presentaban el correspondiente control de roedores usando Ratifin.

El segundo caso era un macho de 9 semanas de edad con un peso de 607,8 g. Dicho animal se lo obtuvo del sector Reina del Cisne de la parroquia Chuquiribamba, en este predio había un sistema de crianza familiar, el manejo o instalaciones de los cuyes consistía en pozas, en este predio se detectó presencia de abortos tres meses antes de la toma de muestras;

en cuanto a la alimentación se empleaba una dieta mixta (forraje más concentrado), se les suministraba agua y tenían contacto con otros animales como perros y gatos, es importante indicar que este predio contaba con control de roedores en donde utilizaban un producto químico comercial.

6.2. Resultados de los tipos de serovares y títulos serológicos

Uno de los dos casos positivos de PCR fue seropositivo en MAT para el serovar Tarassovi con una titulación de 1/50, mientras que el otro animal fue seronegativo.

7. Discusión

Las investigaciones sobre leptospirosis en cuyes mediante PCR son escasas, excepto con propósitos experimentales, por tanto, este animal es usado como referencia para evaluar la conducta de las *Leptospiras* en el organismo, lesiones, respuesta inmunitaria y rutas de entrada, dando como resultado distintos descubrimientos, siendo así una alternativa de investigar en la patogenia y epidemiología de la enfermedad (Zhang et al., 2012; Benavides, 2021).

En esta investigación se logró detectar la presencia de la bacteria en muestras de orina de dos animales mediante PCR convencional, por lo que corrobora la infección por *Leptospira* en cuyes de la parroquia Chuquiribamba criados con fines de consumo. Estos resultados permiten determinar que ambos animales tenían la capacidad de eliminar la bacteria a través de la orina y por lo tanto de transmitir la bacteria a otros cuyes dentro del mismo predio.

Dadas las escasas medidas de bioseguridad que implica el sistema de crianza tradicional es probable que otros animales domésticos pudieran infectarse propagando la infección a otros predios cercanos de la producción, y no menor es el hecho de que el ser humano es una especie susceptible a la infección y durante las actividades de manejo.

En el presente estudio se demuestra que el 2.35% de los animales eran eliminadores de *Leptospira* spp en la población de cuyes evaluada, actuando como hospedadores del agente infeccioso, debido a las características del sistema de crianza y las condiciones adecuadas ambientales de la zona estudiada que permite la exposición a la bacteria. De igual forma, en un estudio realizado en el municipio de Pasto, Nariño para la detección de *Leptospira interrogans* en cobayos destinados al consumo humano se encontró que el (1,5%) resultaron positivos en la PCR, representando la infección natural en la especie documentada (Benavides et al., 2021).

Este estudio reveló que la presencia de roedores en el área de cría de los cobayos es un factor que aumenta la probabilidad de infección. Este riesgo se ve agravado por el uso inadecuado de las instalaciones y la falta de cumplimiento de las normas de protección personal al manejar a los animales o materiales orgánicos que han estado en contacto con la

orina. Estos factores facilitan la transmisión del patógeno a las especies que son vulnerables a la infección.

Por lo tanto, debido a las condiciones presentadas en los sistemas tradicionales-comerciales de producción de cobayos (Benavides et al., 2021), en los que se enfatiza la falta de instalaciones inadecuadas para la crianza; entrada libre para roedores y animales domésticos, permitiendo el contacto directo con los cobayos por ende una posible contaminación del agua y comida con sustancias de desechos, facilitando la diseminación de la bacteria en esta población

Con seguridad, la ausencia de medidas de control de roedores, el manejo de los sistemas de crianza tradicional, y la entrada y salida de diferentes animales susceptibles en los predios o sitios de crianza de cuyes en la parroquia Chuquiribamba se ha transformado en el principal motivo de propagación del agente infeccioso.

PCR es un método con alta especificidad en el diagnóstico de la leptospirosis. Además, permite identificar y detectar un mayor número de animales infectados, por lo que sugiere que es una de las herramientas más eficaces para el diagnóstico de la leptospirosis en animales, especialmente si se utiliza en combinación con la serología, lo que aumenta la sensibilidad del diagnóstico.

De los dos casos confirmados por PCR en este estudio solamente uno fue positivo al diagnóstico serológico detectando al serovar Tarassovi con una titulación de 1/50. En un estudio realizado en la ciudad de Cajabamba Perú en 2020, se observó una seroprevalencia de 40,50% arrojando pruebas de que contenían anticuerpos contra *Leptospira* a través el método de microaglutinación (MAT). Los serovares identificados fueron Icterohaemorrhagiae 19,01% (46/242), Canicola 16,53%, y Pomona 8,68% en cuyes de crianza familiar comercial (Gutiérrez & Morales, 2020), por lo que se espera que en estudios epidemiológicos que usan a la serología como herramienta de diagnóstico las prevalencias sean mucho mayores.

Esto es ampliamente conocido porque está vinculado a los roedores, huéspedes naturales, que actúan como vectores asintomáticos (Laguna, 2000). Aunque los síntomas clínicos pueden variar este serovar se relaciona síndrome icterico o enfermedad de Weil por lo que su hallazgo en cuyes preocupa al respecto del riesgo de contagio de la enfermedad hacia el ser humano (Carrada, 2005).

Existen reportes previos sobre la identificación del serovar Tarassovi en ratas; por ejemplo, en Colombia, en una zona urbana de la ciudad de Medellín reportaron anticuerpos contra serovares de *Leptospira* que rara vez se asocian a *R. norvegicus*, siendo así que la especie es un vigilante de la circulación de diversos serovares. En *R. norvegicus* se registraron títulos para Grippotyphosa (21,0 %), Icterohaemorrhagiae (20,4 %), Canicola (15,9 %), y una baja tasa de anticuerpos para las serovariedades Shermani (6,4 %), fue encontrado también el serovar Tarassovi con (4,5 %) y Pyrogenes (0,6 %) (Agudelo et al., 2010).

Las ratas son susceptibles a infectarse con este serovar porque no hay una especificidad en la que puedan contraer la enfermedad, además, hay que recalcar que un serovar puede tener la capacidad de infectar a múltiples huéspedes, y a su vez, una especie animal puede albergar a varios serovares. Todo esto se puede atribuir a el comportamiento de los roedores que se mueven con libertad y puedan entrar en contacto con otras especies domesticas infectadas con la bacteria, siendo así que la infección se pueda propagar a huéspedes susceptibles. Es importante destacar que la especie *R. norvegicus* juega un papel crucial en la transmisión de *Leptospira* debido a que su población es más numerosa.

Variedad de estudios muestran una alta prevalencia de infección por *Leptospira* spp. en animales de compañía y roedores, incluyendo al cobayo, son vistas como una fuente significativa de infección y propagación de esta enfermedad a los humanos, contribuyendo a la conservación de los ciclos de infección en los huéspedes y a la contaminación del entorno (Díaz et al., 2020).

Con respecto a la titulación encontrada, se sabe que en casos agudos se observa un aumento en los niveles de anticuerpos, sin embargo, en condiciones crónicas, los anticuerpos tienden a regresar a sus niveles normales o basales (Medrano Galarza et al., 2011). En este estudio, la muestra de suero del animal seropositivo aglutinó con el serovar Tarassovi en una dilución de 1/50, diferente a lo reportado por Gutiérrez & Morales en el año (2020) en Cajabamba que encontraron muestras positivas en MAT frente al serovar Icterohaemorrhagiae con títulos de 46/242. En la investigación realizada por Agudelo y colaboradores (2010) en Colombia en la que obtuvieron en cambio títulos para al menos una de las serovariedades probadas.

Por otra parte, de los 2 animales con resultado positivo en PCR solamente en uno se pudo detectar anticuerpos específicos en MAT; lo que podría sugerir que el otro individuo se

encontraba en una fase crónica en la que los anticuerpos resultan indetectables, tal como sucede en ratas, o que el serovar no se encontraba dentro del panel de referencia. El hallazgo de *Leptospira* en cobayos, evidencia la presencia activa de la bacteria, por lo tanto, es imprescindible implementar intervenciones efectivas para prevenir la leptospirosis, a través de sugerencias de prácticas de bioseguridad que minimicen la probabilidad de infección tanto en animales domésticos como en humanos. Los resultados obtenidos evidencian un problema de salud pública, lo que debería alertar a las autoridades de salud del país con fines de vigilancia, control y seguimiento de casos relacionados con la producción animal y manejo de la especie en la zona muestreada.

8. Conclusiones

- El diagnóstico de PCR permitió identificar dos cobayos eliminadores de *Leptospira* (2,35%) en la parroquia de Chuquiribamba del cantón Loja.
- Mediante la prueba MAT se detectó un animal seropositivo de los que registraron resultados positivos en PCR, lo que sugiere que las técnicas moleculares son necesarias para incrementar la especificidad del diagnóstico de leptospirosis en portadores crónicos.
- Este estudio proporciona información valiosa sobre la situación epidemiológica de la leptospirosis en cobayos de la región sur del Ecuador, que debe ser evaluada ya que la presencia del patógeno representa un riesgo de infección tanto para los humanos como para los animales domésticos que interactúan con estos predios de producción.

9. Recomendaciones

- Se recomienda que la parroquia Chuquiribamba al obtener casos positivos de *Leptospira* tenga una adecuada sanidad en la crianza y producción de cuyes, acorde a las distintas medidas de prevención conjuntamente con un control intensivo, poniendo en práctica protocolos para el control de roedores, fuentes de contagio y reservorios.
- Los resultados que ofrece este proyecto sobre *Leptospira* expresa la relevancia de comunicar información a los productores acerca de la gravedad de la leptospirosis y sus riesgos para que tomen las medidas de guía necesarias para la prevención.
- Es necesario llevar a cabo más investigaciones con un conjunto de muestras más amplio sobre la enfermedad en el país para obtener datos más precisos y concisos de animales excretadores de la bacteria. Además, el uso de técnicas moleculares que nos permita identificar la distribución de la enfermedad y adaptar medidas de seguridad necesarias.

10. Bibliografía

- A.M.S.E. (2016). Leptospirosis - Epidemiología y situación mundial. In Asociación de Médicos de Sanidad Exterior.
- Abdullah, M., Kadivella, M., Sharma, R., Baig, M. S., Faisal, M., Azam, S., & Faisal, S. M. (2021). Comparative analysis of whole genome sequences of *Leptospira* spp. from RefSeq database provide interspecific divergence and 2 repertoire of virulence factors 3 4 5 *Corresponding authors: Sarwar Azam (sarwar@niab.org.in) and. BioRxiv Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.01.12.426470>
- Adler, B., & De la Peña, A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 140(3–4), 287–296. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2009.03.012>
- Adler, B., & De la Peña, A. (2015). History of leptospirosis and leptospira. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 387). https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_1
- Agudelo-Flórez, P., Arango, J. C., Merizalde, E., Londoño, A. F., Quiroz, V. H., & Rodas, J. D. (2010). Evidencia serológica de circulación de *Leptospira* spp en *Rattus norvegicus* naturalmente expuestos en una zona urbana Colombiana. *Revista de Salud Pública*, 12(6), 990–999.
- Ahmed, A., & P. Grobusch, M. (2012). Molecular Approaches in the Detection and Characterization of *Leptospira*. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, 03(02). <https://doi.org/10.4172/2155-9597.1000133>
- Ajayi, O. L., Antia, R. E., & Oladipo, T. M. (2021). Dissemination kinetics and pathology of canine *Leptospira icterohaemorrhagiae* isolate in a guinea pig infection model. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 42(3), 314–334. <https://doi.org/10.1080/15321819.2020.1863818>
- Balcázar, D. (2016). Plan estratégico de desarrollo turístico sostenible para la parroquia Chuquiribamba del cantón Loja. *Universidad Técnica Particular de Loja*. 26, 29, 13, 14, 16, 113, 114.
- Ballard, S. A., Adler, B., Millar, B. D., Chappel, R. J., Jones, R. T., & Faine, S. (1984). The immunoglobulin response of swine following experimental infection with leptospira interrogans serovar pomona. *Zentralblatt Für Bakteriologie, Mikrobiologie Und*

- Hygiene. 1. Abt. Originale. A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten Und Parasitologie, 256(4), 510–517. [https://doi.org/10.1016/S0174-3031\(84\)80027-X](https://doi.org/10.1016/S0174-3031(84)80027-X)
- Bautista, B. (2019). Leptospirosis : enfermedad de importancia en salud pública
Leptospirosis : a disease of importance in public health . Leptospirosis : enfermedad de importancia en salud pública Leptospirosis : a disease of importance in public health .
Revista Colombiana de Ciencia Animal RECIA, 11, 727.
<https://revistas.unisucre.edu.co/index.php/recia/article/view/Articulo727/835>
- Benavides-Benavides, B., Cisneros-López, H. D., & Peláez-Sánchez, R. G. (2021). Evidencia molecular de *Leptospira interrogans sensu stricto* en *Cavia porcellus* (cuyes) destinados para el consumo humano en el municipio de Pasto, Nariño. *Universidad y Salud*, 24(1), 55–64. <https://doi.org/10.22267/rus.222401.258>
- Branger, C., Blanchard, B., Fillonneau, C., Suard, I., Aviat, F., Chevallier, B., & André-Fontaine, G. (2005). Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene *hap1* encoding the hemolysis-associated protein-1. *FEMS Microbiology Letters*, 243(2), 437–445. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.01.007>
- Brenner, D. J., Kaufmann, A. F., Sulzer, K. R., Steigerwalt, A. G., Rogers, F. C., & Weyant, R. S. (1999). Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(2), 839–858. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-839>
- Bustamante Alfonso, L. M. (2019). Revista cubana de medicina general integr. Revista Cubana de Medicina General Integral, 26(1), 0–0.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252010000100015
- Caimi, K., & Ruybal, P. (2020). *Leptospira* spp., a genus in the stage of diversity and genomic data expansion. *Infection, Genetics and Evolution*, 81(February), 104241. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104241>
- Calvopiña-Fernández, A. (2018). Estudio de factibilidad para la construcción de una sala de faenamiento para cuyes en la empresa URKUAGRO UASAK SA. (CUYERA ANDINA). *Revista Volu*, 151.
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/16013/1/T-UCE-0014-MVE-013.pdf>
- Carrada, T. (2005). Leptospirosis humana. Historia natural, diagnóstico y tratamiento. *Rev*

- Mex Patol Clin*, 52(4), 246–256. <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2005/pt054f.pdf>
- Carranza, A., Chang, D., & Gutierrez, Y. (2020). Leptospirosis y enfermedad de Weil Leptospirosis and Weil's syndrome. *Revista Médica Sinergia*, 5(3), 12. <https://doi.org/https://doi.org/10.31434/rms.v5i3.346>
- Casanovas-Massana, A., Hamond, C., Santos, L. A., de Oliveira, D., Hacker, K. P., Balassiano, I., Costa, F., Medeiros, M. A., Reis, M. G., Ko, A. I., & Wunder, E. A. (2020). *Leptospira yasudae* sp. Nov. and *Leptospira stimsonii* sp. nov., two new species of the pathogenic group isolated from environmental sources. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(3), 1450–1456. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003480>
- Castillo, M. (2014). “ *Leptospira* En Ganado Bovino .” Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, 1–71. [http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/7131/MARISOL CASTILLO HERNÁNDEZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/7131/MARISOL_CASTILLO_HERNÁNDEZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Cerqueira, G. M., & Picardeau, M. (2009). A century of *Leptospira* strain typing. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(5), 760–768. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.009>
- Chacón, N. C. (2014). REPORTE DE UN CASO Leptospirosis. *Medicina Legal de Costa Rica*, 31(2), 112–118. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1409-00152014000200012&lng=pt&nrm=iso&tlng=es
- Chirathaworn, C., Inwattana, R., Poovorawan, Y., & Suwancharoen, D. (2014). Interpretation of microscopic agglutination test for leptospirosis diagnosis and seroprevalence. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(Suppl 1), S162–S164. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C580>
- Close, B., Banister, K., Baumans, U., Bernoth, E. M., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W., & Flecknell, P. (1997). Recomendaciones para la eutanasia de los animales de experimentación. Parte 2. *Laboratory Animals*, 31, 1–32. <https://sea.umh.es/files/2011/07/eutanasia2.pdf>
- Correia, L., Loureiro, A. P., & Lilenbaum, W. (2019). Reduced susceptibility in leptospiral strains of bovine origin might impair antibiotic therapy. *Epidemiology and Infection*,

147(i). <https://doi.org/10.1017/S0950268818002510>

- Dangond, A. (2015). Detección serológica y por campo oscuro de *Leptospira* spp. en yeguas criollas colombianas ubicadas en predios del departamento de Cundinamarca. *Medicina Veterinaria*. https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/52
- Días, G. (2019). Asociación entre especies patógenas de *leptospira* spp. y sus reservorios domésticos no roedores, dentro de una localidad urbana de la amazonia peruana. in universidad peruana cayetano heredia Escuela de Posgrado. Universidad peruana Cayetano Heredia. https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/6686/Asociacion_DiazOrtiz_Gerardo.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Díaz, Á. L. M., Arias, J. A. V., Iriarte, G. D. F., & Ramírez, J. J. Q. (2020). Leptospirosis en reservorios animales: Una revisión de tema. *Revista Lasallista de Investigacion*, 17(2), 267–279. <https://doi.org/10.22507/rli.v17n2a23>
- Ellis, W. A. (2015). Animal Leptospirosis. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 387). https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_6
- Ellis, W. A., Montgomery, J. M., & Thiermann, A. B. (1991). Restriction endonuclease analysis as a taxonomic tool in the study of pig isolates belonging to the Australis serogroup of *Leptospira interrogans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(5), 957–961. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.5.957-961.1991>
- Gagea, M., & Craig, S. (2012). Euthanasia and Necropsy. In *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents* (First Edit, pp. 117–139). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00004-3>
- Galloway, R. L., & Levett, P. N. (2010). Application and validation of PFGE for serovar identification of *Leptospira* clinical isolates. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000824>
- García, R., Reyes-Torres, A., Basilo-Hernandez, D., Rivas-Sanchez, B., & Ramirez-Perez, M. (2013, March). Leptospirosis; un problem a de salud publica. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina (FM), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)., 60, 57–70. <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2013/pt131g.pdf>

- Gutiérrez, A., & Morales, S. (2020, December). Determinación de anticuerpos contra serovares de *Leptospira* spp en cuyes de crianza familiar-comercial en Cajabamba, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 31(4), e19043. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i4.19043>
- Hamer, M., Saraullo, V., Brihuega, B., Watanave, O., Martinez, M., & Grune, S. (2019). Comparación de métodos de extracción de ADN simples y económicos para el diagnóstico molecular de leptospirosis animal. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, 18(2), 68–73. <https://doi.org/10.14409/favecv.v18i2.8752>
- Jorge, S., Hartleben, C. P., Seixas, F. K., Coimbra, M. A. A., Stark, C. B., Larrondo, A. G., Amaral, M. G., Albano, A. P. N., Minello, L. F., Dellagostin, O. A., & Brod, C. S. (2012). *Leptospira borgpetersenii* from free-living white-eared opossum (*Didelphis albiventris*): First isolation in Brazil. *Acta Tropica*, 124(2), 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.07.009>
- Khalili, M., Sakhaee, E., Afatoonian, M. R., Abdollahpour, G., Tabrizi, S. S., Damaneh, E. M., & Hossini-nasab, S. (2014). Seroprevalence of bovine leptospiral antibodies by microscopic agglutination test in Southeast of Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(5), 354–357. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C1206>
- Koizumi, N., & Picardeau, M. (2020). *Leptospira* spp. Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology* 2134. <http://www.springer.com/series/7651>
- Laguna, V. (2000). Leptospirosis: modulo tecnico. *Instituto Nacional de Salud*, 1–56. <https://www.ins.go.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/m%20b3dulo%20t%20a9cnico%20%20leptospirosis.pdf>.
- Le Turnier, P., & Epelboin, L. (2019). Mise au point sur la leptospirose. *La Revue de Médecine Interne*, 40(5), 306–312. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2018.12.003>
- Lemus, J., Cabezas, A., Zaldívar, I., Gonzáles, E., & Ramos, Y. (2017). Observaciones clínico patológicas en ratas Wistar gestadas infectadas experimentalmente con leptospiras. *Clinical and pathological observations in experimentally infected pregnant wistar rats with leptospire*. 21(3), 354–361. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S156131942017000300009&lnges
- Léon, A., Pronost, S., Tapprest, J., Foucher, N., Blanchard, B., André-Fontaine, G., Laugier, C., Fortier, G., & Leclercq, R. (2006). Identification of pathogenic *Leptospira* strains in

- tissues of a premature foal by use of polymerase chain reaction analysis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18(2), 218–221. <https://doi.org/10.1177/104063870601800216>
- Levett, P. N. (2015). Systematics of leptospiraceae. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387, 11–20. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_2
- Lourdault, K., Aviat, F., & Picardeau, M. (2009). Use of quantitative real-time PCR for studying the dissemination of *Leptospira interrogans* in the guinea pig infection model of leptospirosis. *Journal of Medical Microbiology*, 58(5), 648–655. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.008169-0>
- Luján, E., Pérez, R., & Olmos, M. (2019). Leptospirosis en animales de compañía . Marco jurídico en salud animal y salud pública. <https://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/2214/LUJAN%2CEVELIN%20SOFIA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Luna, A., Moles, C., & Gavaldón, R. (2008). La leptospirosis canina y su problemática en México. *Rev. Salud ...*, 30(1), 1–11. <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v30n1/rsa01108.pdf>
- Marquez, A., Djelouadji, Z., Lattard, V., & Kodjo, A. (2017). Overview of laboratory methods to diagnose leptospirosis and to identify and to type leptospire. *International Microbiology*, 20(4), 184–193. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.302>
- Martin, P. (2018). DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSIS CANINA MEDIANTE UNA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL. In *UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA Facultad de Ciencias Veterinarias. UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA Facultad de Ciencias Veterinarias*. edici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/67994/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Martin, P., Arauz, M., & Stanchi, N. (2015). Leptospirosis mediante técnicas moleculares. *Analecta Vet*, 3(1), 26–38. <https://doi.org/10.24215/15142590ep.%2026-38>
- Martínez, M. (2018). Desarrollo y validación de un inmunoensayo para diagnóstico de Leptospirosis bovina en la región Pampeana Argentina. 22–142. http://repositorioubasibbi.uba.ar/gsd/collect/posgraafa/index/assoc/HWA_2901.dir/2901.PDF

- Matamala, S. (2018). Evaluación de la prueba mat y pcr en sangre y orina para determinar el estatus de infección de vacas lecheras abortadas dentro de los siete días post aborto. *Energies*, 6(1), 1–8. <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1120700020921110%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.reuma.2018.06.001%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.arth.2018.03.044%0Ahttps://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1063458420300078?token=C039B8B13922A2079230DC9AF11A333E295FCD8>
- Medrano Galarza, C., Díaz Rojas, C. A., & Dalmau Barros, E. A. (2011). Diagnóstico de leptospirosis canina por medio de las técnicas Dot-ELISA y MAT en perros con enfermedad renal en Bogotá. *Revista de Medicina Veterinaria*, 1(21), 133–145. <https://doi.org/10.19052/mv.568>
- MINAGRI. (2019). Carne de cuy. Ministerio de Agricultura y Riego. Potencial. <https://bibliotecavirtual.midagri.gob.pe/index.php/analisis-economicos/estudios/2019/19-potencial-del-mercado-interno-de-carne-de-cuy-2019/file>
- Ministry of Health of Peru. (2006). Norma técnica de salud para la atención integral de la persona afectada con leptospirosis humana. 23. <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/2358.pdf>
- Minter, A., Diggle, P. J., Costa, F., Childs, J., & Ko, A. I., & Begon, M. (2017). Leptospirosis en reservorios animales: Una revisión de tema. *Revista Lasallista de Investigacion*, 19(4), 555–561. <https://doi.org/10.22507/rli.v17n2a23>
- Monzon Tamargo ;María de Jesús. (2019). Morfometría de corazón y pulmón en ratas Wistar infectadas con leptospira canícola durante la preñez. *Rev Ciencias Médicas*, 23(4), 542–552. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-31942019000400542&lang=pt
- MOSQUERA ESCOBAR, M. et al. (2022). *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del*. 26(2), 5498. <file:///C:/Users/ACER/Downloads/5498-29249-1-PB.pdf>
- MSP. (2023). <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2023/01/GACETA-ZOONOTICA-SE-51.pdf>
- Nagel, A. G., Dra, D., & Cynthia, K. (2019). Caracterización molecular y celular de la virulencia de un clon mayoritario de *Leptospira interrogans* en Argentina . https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n6944_Nagel.pdf

- Nattaly Márquez, F., Roberto Valencia, L., Lili Chauca, F., & Gemma Verde, Z. (2019). Anatomical study of the Guinea pig glans (*Cavia porcellus*) of the Peru breed. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 30(3), 995–1002. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i3.16722>
- Nieves, C. (2018). Estudios genómicos y moleculares de bacterias del género *Leptospira*: análisis de la variabilidad genética y contribución en diagnóstico y tipificación. In *Pedeciba*. Institut Pasteur de Montevideo. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/23242/1/uy24-19060.pdf>
- Niloofoa, R., Narmada, F., De Silva, N., Karunanayake, L., Wickramasinghe, H., Dikmadugoda, N., Premawansa, G., Wickramasinghe, R., De Silva, H. J., Premawansa, S., Rajapakse, S., & Handunnetti, S. (2015). Diagnosis of leptospirosis: Comparison between microscopic agglutination test, IgM-ELISA and IgM rapid immunochromatography test. *PLoS ONE*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0129236>
- Nossa, L. (2017). Estudio Descriptivo De *Leptospira* Spp. Dentro De Una Explotación Lechera Con Seropositividad Previamente Detectada, Ubicada En La Calera, Cundinamarca. 1–121. <https://pdfs.semanticscholar.org/2ef2/a28d4ed058f487eb3555d9de8d8daff9b806.pdf>
- OIE. (2021a). LEPTOSPIROSIS. In *Manual Terrestre de la OIE 2021* (p. 14).
- Oliveira, S. T., Messick, J. B., Biondo, A. W., Santos, A. P., Guimarães, A. M. de S., Mohamed, A. S., Neto, J. A. S. P., Dalmolin, M. L., & González, F. H. D. (2010). Serum and urinary C-reactive protein concentrations in dogs with leptospirosis. *Acta Scientiae Veterinariae*, 38(3), 245–249. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.17057>
- OMSA. (2021). LEPTOSPIROSIS. In *Manual Terrestre de la OIE 2021* (p. 14).
- Oses, R., Bonet, J., Rodríguez, O., Saura, G., & Pedraza, A. (2010). Evaluación del comportamiento de la leptospirosis humana mediante un modelo matemático atendiendo a variables climáticas como predictoras. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 11(03B), 1–12. <https://www.redalyc.org/pdf/636/63613140034.pdf>
- Ospina-Pinto, C., Rincón-Pardo, M., Soler-Tovar, D., & Hernández-Rodríguez, P. (2017). The role of rodents in the transmission of *Leptospira* spp. In swine farms. *Revista de Salud Publica*, 19(4), 555–561. <https://doi.org/10.15446/rsap.v19n4.41626>

- Peña, J. (2014). La Leptospirosis , Y Sus Efectos En Los Animales. 2–4. https://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/comun_varias_especies/64-Leptospirosis.pdf
- Picardeau, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 43(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.11.005>
- Revelo, A. R., de la Torre, E. M., Martínez, G. C., Baquero, M. C., & Casart, Y. Q. (2020). Evaluation of genomic DNA extraction methods for the identification of *Leptospira* spp. In bovine urine samples by PCR. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 31(2), 1–12. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i2.15522>
- Ricaldi, J. N., Fouts, D. E., Selengut, J. D., Harkins, D. M., Patra, K. P., Moreno, A., Lehmann, J. S., Purushe, J., Sanka, R., Torres, M., Webster, N. J., Vinetz, J. M., & Matthias, M. A. (2012). Whole Genome Analysis of *Leptospira licerasiae* Provides Insight into Leptospiral Evolution and Pathogenicity. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001853>
- Romero-Vivas, C. M., & Falconar, A. K. (2016). *Leptospira* spp. and human leptospirosis. *Salud Uninorte*, 32(1), 123–143. <https://doi.org/10.14482/sun.32.1.8479>
- Saito, M., Villanueva, S. Y. A. M., Kawamura, Y., Iida, K. I., Tomida, J., Kanemaru, T., Kohno, E., Miyahara, S., Umeda, A., Amako, K., Gloriani, N. G., & Yoshida, S. I. (2013). *Leptospira idonii* sp. nov., isolated from environmental water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART7), 2457–2462. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.047233-0>
- Sanchez Arturo, E. (2011). Deteccion de *Leptospira* patogena en orina de pacientes cronicos y perros mediante PCR en el Valle de Cauca. 81. <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/2944911>
- Sadow, K., & Ramírez, W. (2005). Leptospirosis (Leptospirosis) K. REDVET. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 1(6), 1–61. <https://www.redalyc.org/pdf/636/63612649001.pdf>
- Saul. (2019). 3 Enfermedades Que Pueden Transmitir Las Cobayas A Los Humanos. *Mascota Fiel*, 5–8. <https://mascotafiel.com/enfermedades-que-pueden-transmitir-las-cobayas/>

- SENASA. (2016). Síntomas y tratamiento de la Leptospirosis en animales. SENASA. <https://www.senasa.gob.pe/senasacontigo/sintomas-y-tratamiento-de-la-leptospirosis-en-animales/>
- Serrano-Martínez, E., César Burga, C., Elizabeth Hinostroza, M., & Renato Zúñiga, F. (2020). Influence of climatic seasons in the presence of canine leptospirosis in northern and central Lima, Peru. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 31(4), 1–9. <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V31I4.19018>
- Spickler, A., & Leedom, K. (2015). Equine Leptospirosis : Disease Overview and the Risks and Economic Ramifications of Leptospira-Associated Recurrent Uveitis and Leptospiral Abortion. *Zoetis, August*, 1–12.
- Stoddard, R. A. (2013). Detection of pathogenic leptospira spp. through real-time PCR (qPCR) targeting the lipL32 gene. *Methods in Molecular Biology*, 943, 257–266. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-353-4_17
- Sulzer, K. R., & Rogers, F. (1987). Deoxyribonucleic Acid Relatedness between Serogroups and Serovars in the Family. 37(4). <https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-407>
- Territoriales, C. de I. (2023). *cCentro de investigaciones Territoriales*. Ánfora. <https://doi.org/10.30854/anf.v1.n2.1993.466>
- Thibeaux, R., Girault, D., Bierque, E., Soupé-Gilbert, M. E., Rettinger, A., Douyère, A., Meyer, M., Iraola, G., Picardeau, M., & Goarant, C. (2018). Biodiversity of environmental Leptospira: Improving identification and revisiting the diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00816>
- Torres-Castro, M., Hernández-Betancourt, S., Agudelo-Flórez, P., Arroyave-Sierra, E., Zavala-Castro, J., & Puerto, F. I. (2016). [Current review of the epidemiology of leptospirosis]. *Revista Medica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 54(5), 620–625. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27428344>
- Valverde-latorre, F. X., Ortega-Ramos, V. Y., Yunga-quimi, A. X., & Zamora-Rodriguez, A. R. (2021). Incidencia, prevalencia e identificación de factores de riesgo asociados a la infección por leptospira. *Revista Científica Dominio de Las Ciencias*, 7, 152–172.
- Valverde, M. de los A., Goris, M. G. A., González, V., Anchia, M. E., Díaz, P., Ahmed, A., & Hartskeerl, R. A. (2013). New serovars of Leptospira isolated from patients in Costa

- Rica: Implications for public health. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 1263–1271. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.058545-0>
- Vicente, A. T., Schiettekatte, O., Goarant, C., Identidad, C. D. E., & Neela, V. K. (2019). Revisando la taxonomía y la evolución de la patogenicidad del género *Leptospira* a través de la genómica prismof. 1–15. [10.1371/journal.pntd.0007270](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270).
- Woods, K., Nic-Fhogartaigh, C., Arnold, C., Boutthasavong, L., Phuklia, W., Lim, C., Chanthongthip, A., Tulsiani, S. M., Craig, S. B., Burns, M. A., Weier, S. L., Davong, V., Sihalath, S., Limmathurotsakul, D., Dance, D. A. B., Shetty, N., Zambon, M., Newton, P. N., & Dittrich, S. (2018). A comparison of two molecular methods for diagnosing leptospirosis from three different sample types in patients presenting with fever in Laos. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(9), 1017.e1-1017.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.017>
- Yagual, W. (2016). Universidad de guayaquil leptospirosis en población infantil atendida en hospital tutor dr . víctor alvarado guayaquil-ecuador. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/33535>
- Yzquierdo, J. (2017). Revista Cubana de Medicina General Leptospirosis humana : un abordaje epidemiológico desde los factores from environmental factors. 33(1), 1–11. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252017000100011
- Zaldivar, F. (2007). Realidad y perspectiva de la Crianza de Cuyes en los países andinos. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 15(1), 35–43. <http://www.bioline.org.br/pdf?la07058>
- Zhang, Y., Lou, X. L., Yang, H. L., Guo, X. K., Zhang, X. Y., He, P., & Jiang, X. C. (2012, January). Establishment of a leptospirosis model in guinea pigs using an epicutaneous inoculations route. *BMC Infectious Diseases*, 12, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-20>
- Zunino Martini, E., & Pizarro P., R. (2007). Leptospirosis. Puesta al día. *Revista Chilena de Infectología*, 24(3), 220–226. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182007000300008>

11. Anexos

Anexo 1. Compra de los cobayos



Anexo 2. Procedimiento por técnica de concusión



Anexo 3. Toma de muestras de sangre



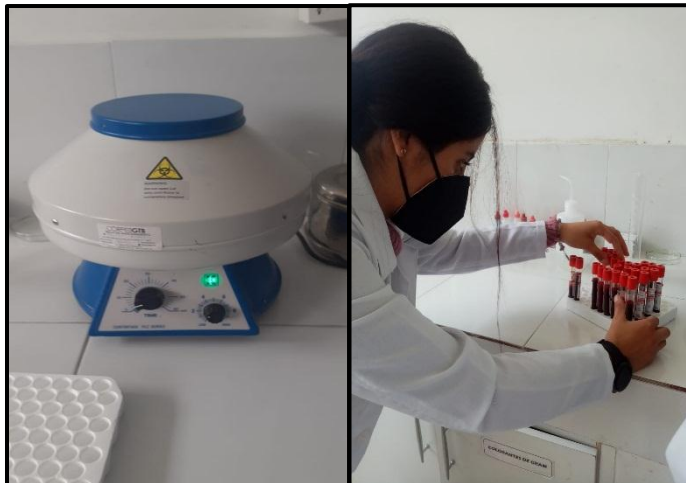
Anexo 4. Toma de muestras de orina



Anexo 5. Adquisición de las muestras de sangre y orina



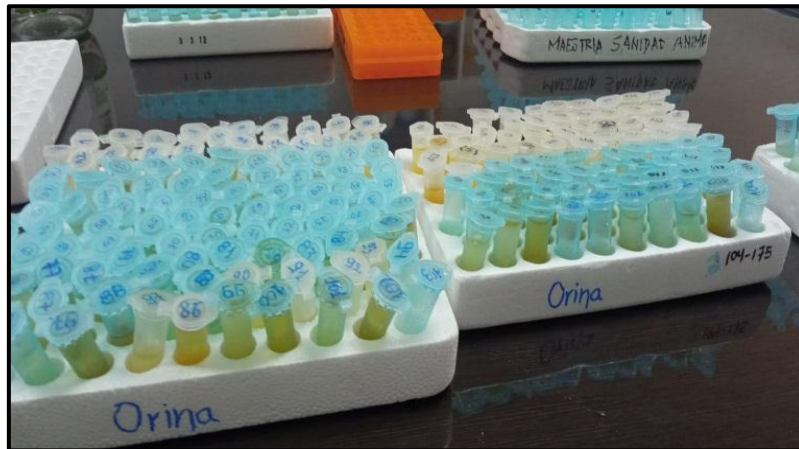
Anexo 6. Centrifugación de las muestras de sangre



Anexo 7. Adquisición de suero sanguíneo



Anexo 8. Muestras de orina para su procesamiento



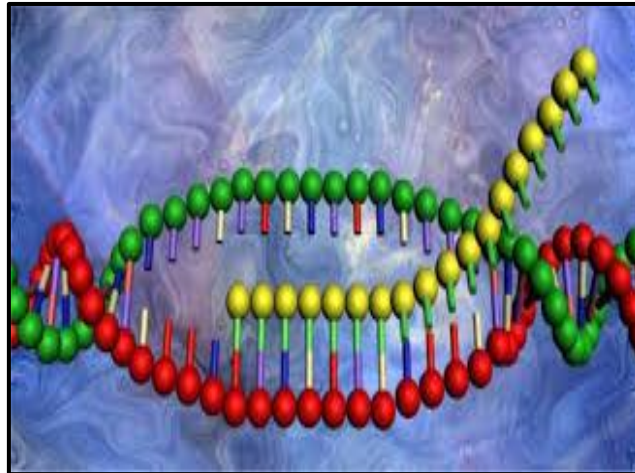
Anexo 9. Muestras de orina en termociclador



Anexo 10. Proceso en PCR convencional



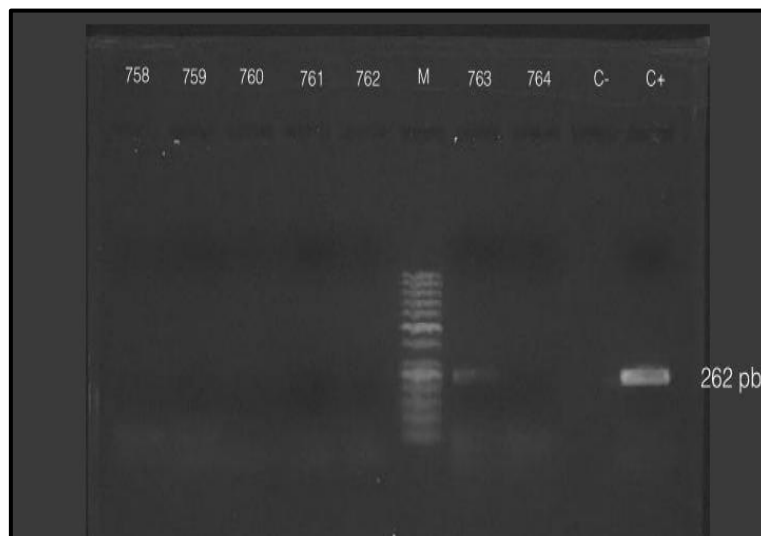
Anexo 11. Proceso de replicación y duplicación del ADN



Anexo 12. Proceso de electroforesis



Anexo 13. Resultados



Anexo 14. Certificado de Traducción del Resumen

Loja, 20 de noviembre de 2023

CERTIFICACIÓN DE TRADUCCIÓN

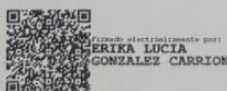
Doctora.
Erika Lucía González Carrión, Ph.D.
Docente de la Facultad de la Educación, el Arte y la Comunicación de la Universidad
Nacional de Loja

CERTIFICO:

En mi calidad de traductora del idioma Inglés, con capacidades que pueden ser probadas a través de las traducciones realizadas para revistas de alto impacto como: Comunicar(Q1): <https://bit.ly/3v0JggL> así como a través de la Certificación de conocimiento del Inglés, nivel B2, que la traducción del Resumen (Abstract) del Trabajo de Titulación denominado: “**Detección de *Leptospira* spp. en cobayos de la parroquia Chuquiribamba del catón Loja**”; de autoría de la estudiante: **Claudia Stefania Quizhpe Criollo**, con CI: **1150589446**, es correcta y completa, según las normas internacionales de traducción de textos.

Es cuanto puedo certificar en honor a la verdad, facultando a la interesada, **Claudia Stefania Quizhpe Criollo** hacer uso legal del presente, según estime conveniente.

Atentamente,



Dra. Erika González Carrión. PhD.

Docente de la Facultad de la Educación, el Arte y la Comunicación Universidad
Nacional de Loja