



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE INGENIERO AGROPECUARIO

Seroprevalencia de leptospirosis (*Leptospira hardjo*) en bovinos de aptitud lechera y doble propósito en Ecuador.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Maza Herrera, Manuel Agustin

DIRECTOR: Saa, Luis Rodrigo, Ph. D

LOJA-ECUADOR

2015

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Doctor.

Luis Rodrigo Saa, Ph.D.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Seroprevalencia de Leptospirosis (*Leptospira hardjo*) en bovinos de aptitud lechera y doble propósito en Ecuador, realizado por Maza Herrera Manuel Agustin, ha sido orientado y revisado durante su ejecución en su totalidad, por lo cual se aprueba la presentación del mismo.

Loja, 22 de julio de 2015

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Maza Herrera Manuel Agustin declaro ser autor del presente trabajo de titulación: Seroprevalencia de Leptospirosis (*Leptospira hardjo*) en bovinos de aptitud lechera y doble propósito en Ecuador, de la Titulación de Ingeniería Agropecuaria siendo el Dr. Luis Rodrigo Saa, Ph.D. director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.....

Autor: Maza Herrera Manuel Agustin

Cédula: 1105163065

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico con amor:

A Dios quien me enseña el camino correcto y día a día me bendice.

A mis padres, con su ejemplo de lucha han desarrollado en mí la fortaleza para superar los retos.

A mis hermanos y sobrinos por compartir su tiempo y alegrías, constituyéndose en el soporte fundamental para alcanzar las metas planteadas.

A mis familiares por el apoyo brindado durante todo el tiempo mediante sus palabras de ánimo.

AGRADECIMIENTO

A la Titulación de Ingeniería Agropecuaria, por permitirme ser parte de esta noble carrera, a todo su equipo docente quienes aportando con cada una de sus enseñanzas he desarrollado mi formación profesional.

Al Laboratorio de Sanidad Animal y Zoonosis por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo de fin de titulación y proveer todos los recursos necesarios.

A mi Director de Tesis Dr. Luis Rodrigo Saa, Ph.D. por la conducción de esta investigación, por su amistad, por sus consejos, paciencia y conocimientos.

A mis amigos de Agropecuaria quienes durante este tiempo sus palabras de aliento y momentos compartidos hicieron más placentera la consecución de esta meta.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE MAPAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.....	4
MARCO TEÓRICO	4
1.1. Aspectos históricos del género <i>Leptospira</i>	5
1.2. Descripción del género <i>Leptospira</i>	5
1.3. Taxonomía y Clasificación.	6
1.3.1. Taxonomía.	6
1.3.2. Clasificación serológica.....	7
1.3.3. Clasificación genotípica.....	8
1.4. Estructura antigénica.	10
1.5. Respuestas inmunes innatas y adquiridas.....	10
1.6. Epidemiología.....	11
1.7. Patología y lesiones en el hospedador.....	13
1.8. Leptospirosis en animales.	14
1.8.1. Leptospirosis aguda.....	14
1.8.2. Leptospirosis crónica.	14
1.9. Leptospira en humanos.	15
1.9.1. Manifestaciones clínicas.....	18
a. <i>Leptospirosis aguda</i>	18
b. <i>Leptospirosis crónica</i>	18
1.9.2. Impacto económico	18
1.10. Diagnóstico.	19

1.10.1.	Análisis serológicos	19
a.	MAT (prueba de aglutinación microscópica)	20
b.	ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	20
1.10.2.	Técnicas de diagnóstico molecular.....	21
a.	PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	21
1.10.3.	Pruebas de inmunofluorescencia.....	22
a.	Prueba directa de anticuerpos fluorescentes	22
b.	Prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes	22
1.11.	Medidas de prevención y profilaxis.....	24
CAPÍTULO II		25
DISEÑO METODOLÓGICO		25
2.1	Población de estudio.....	26
2.2	Determinación del tamaño de la muestra.....	26
2.3	Obtención y procesado de las muestras de sangre.....	29
2.4	Análisis serológico ELISA.....	30
2.5	Descripción de las variables.....	30
2.5.1	Variables de localización:	30
2.5.2	Variables relacionadas con las características de las explotaciones:	30
2.5.3	Variables relacionadas con las instalaciones:	30
2.5.4	Variables relacionadas con la reproducción:	30
2.5.5	Parámetros relacionados con los animales:.....	30
2.6	Análisis de datos.	30
2.6.1	Análisis estadístico descriptivo (univariante).....	31
2.7	Diseño de mapas coropléticos.....	31
CAPÍTULO III		32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		32
3.1	Seroprevalencia aparente de <i>Leptospira hardjo</i> en Ecuador.	33
3.2	Seroprevalencia real de <i>Leptospira hardjo</i> en Ecuador.....	34
3.3	Seroprevalencia de <i>Leptospira hardjo</i> por aptitud.....	35
3.4	Seroprevalencia de <i>Leptospira hardjo</i> por edad.....	36
3.5	Seroprevalencia de <i>Leptospira hardjo</i> por sexo.....	37
3.6	Seroprevalencia de <i>Leptospira hardjo</i> por cantones.....	38
3.7	Seroprevalencia de <i>Leptospira hardjo</i> por provincias	41
3.8	Dispersión de <i>Leptospira hardjo</i> en explotaciones de Ecuador.....	42

CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXOS	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Taxonomía del género <i>Leptospira</i>	6
Figura 2. Epidemiología de la leptospirosis.....	13
Figura 3: Muestreo con WinEpiscope 2.0.....	27
Figura 4. Uso del programa estadístico SPSS 15. 0.....	31
Figura 5. Seroprevalencia de <i>Leptospira hardjo</i> en bovinos de Ecuador.....	33
Figura 6. WinEpiscope 2.0.....	34
Figura 7. Seroprevalencia de <i>Leptospira hardjo</i> por aptitud.....	35
Figura 8. Seroprevalencia de <i>Leptospira hardjo</i> por edad.....	36
Figura 9. Seroprevalencia de <i>Leptospira hardjo</i> por sexo.....	37
Figura 10. Seroprevalencia de <i>Leptospira hardjo</i> por sexo.....	39
Figura 11. Dispersión de <i>Leptospira hardjo</i> en explotaciones de Ecuador.....	42

ÍNDICE DE MAPAS

Mapa 1: Seroprevalencia de <i>Leptospira hardjo</i> por cantones.....	40
Mapa 2: Seroprevalencia de <i>Leptospira hardjo</i> por provincias en Ecuador.....	41
Mapa 3: Dispersión de <i>Leptospira hardjo</i> en explotaciones de Ecuador.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Serogrupos y serovares de <i>Leptospira sp.</i>	8
Tabla 2. Genomoespecies de <i>Leptospira</i> y distribución de los serogrupos.....	9
Tabla 3. Serovares de <i>Leptospira</i> que se encuentran en varias especies.....	10
Tabla 4. Serovares prevalentes en animales silvestres y domésticos.....	12
Tabla 5. Seroprevalencia de leptospirosis en bovinos en países en América.....	15
Tabla 6. Incidencia anual de leptospirosis en América y otros países.....	17
Tabla 7. Costo de vacunación.....	19
Tabla 8 Métodos de ensayo disponibles para el diagnóstico de la leptospirosis y su propósito.....	23
Tabla 9. Seroprevalencia por cantones	38

RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica distribuida mundialmente, producida por bacterias del género *Leptospira*. La especie *Leptospira hardjo* es el agente endémico con mayor prevalencia causante de leptospirosis en ganado bovino. Este estudio se llevó a cabo para determinar la seroprevalencia de leptospirosis en bovinos de aptitud lechera y doble propósito en Ecuador. Un total de 2668 muestras de sangre fueron recolectadas mediante muestreo estratificado en 386 hatos de aptitud lechera y doble propósito. Las muestras fueron analizadas mediante la técnica de ELISA indirecto para detectar anticuerpos IgG contra *Leptospira hardjo*. El análisis de datos se realizó mediante el programa estadístico SPSS 15.0. La seroprevalencia fue de 16,5%, la prevalencia intrarrebaño fue 9,5% y una dispersión de 42% del total de bovinos muestreados. Esta investigación es el primer informe epidemiológico de *Leptospira interrogans serovar hardjo* desarrollado en ganado bovino de aptitud lechera y doble propósito en Ecuador.

Palabras clave: Leptospirosis, *Leptospira hardjo*, seroprevalencia, bovinos, Ecuador.

ABSTRACT

Leptospira hardjo is the causative agent of zoonotic disease in bovine. This mainly disease affects cattle, causing severe economic loss for producers. Lespospirosis is worlwide distribution with serious effects in domestic and wild animals. The objective of this study was to determine the seroprevalence of leptospirosis in non-vaccinated dairy and dual-purpose cattle herds from Ecuador. A total of 2,668 serum samples from 386 herds were collected between June 2008 and July 2011 using stratified sampling in 386 herds and analyzed by indirect ELISA. Single seroprevalence, true prevalence, intra herd prevalence and dispersion were analized in eight provinces with high potential dairy (64% of total country production). The real seroprevalence was 16.5%, the intraherd prevalence was 9,5% and the dispersion 42% of the total sampled bovines. This research is the first epidemiological report of infection by *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* conducted on aptitude dairy bovine cattle and dual-purpose in Ecuador.

Keywords: Leptospirosis, *Leptospira hardjo*, seroprevalence, cattle, Ecuador.

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica causada por bacterias del género *Leptospira* pertenecientes a la familia Leptospiraceae. La especie *Leptospira interrogans serovar hardjo* es el agente etiológico más importante causante de leptospirosis en ganado bovino (Grooms, 2006; Deanna et al., 2013). Esta patología es de amplia difusión y de propagación mundial. En Ecuador se reportó en el año 2009 (Manock et al., 2009) y 2013 (Gamboa et al., 2013) en pacientes humanos febriles de la región amazónica y costera respectivamente. En humanos y animales domésticos puede causar manifestaciones clínicas que van desde síntomas leves hasta agudos y crónicos que pueden causar la muerte (Rodrigues et al., 2015; Subharat, 2010; André-Fontaine, 2006; Grooms, 2006).

La especie *L. hardjo* en ganado bovino genera: fallos reproductivos, abortos, mortinatos, momificación fetal, terneros débiles (Alder y De la Peña, 2010). En rebaños lecheros, el síntoma principal que provoca es un descenso brusco de producción de leche con anomalías organolépticas de la misma (Manual de Merck, 2007; Salgado, 2014), siendo de consideración para la economía del productor. La leptospirosis es una infección zoonótica de reporte obligatorio en el país constituyendo el presente trabajo investigativo de relevante importancia para la salud pública ecuatoriana.

El objetivo del presente trabajo fue describir la seroepidemiología de la infección por *Leptospira interrogans serovar hardjo* en bovinos de aptitud lechera y doble propósito en Ecuador analizando la prevalencia individual y dispersión (prevalencia por explotaciones), en las principales provincias productoras de ganado lechero y de doble propósito (64% de la producción total del país) un total de 2668 muestras fueron recolectadas mediante muestreo estratificado en 386 hatos de producción láctea y de doble propósito, y analizadas mediante la técnica de ELISA (Enzyme Immunosorbent Assay); dando como resultado una prevalencia de 16,5% (CI₉₅), una dispersión de 42% (CI₉₅) y una media intrarrebaño de 9,5% (CI₉₅).

Esta investigación es el primer reporte epidemiológico de infección por *Leptospira interrogans serovar hardjo* en ganado bovino de aptitud lechera y doble propósito en Ecuador.

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

1.1. Aspectos históricos del género *Leptospira*.

La leptospirosis fue reportada en 1886 por Adolf Weil en Heidelberg-Alemania, sin embargo, en años anteriores ya fue descrito un síndrome idéntico en trabajadores de alcantarillas en el mismo país. En la antigua China fue reconocida como una infección de riesgo ocupacional de cosechadores de arroz así, en Japón se la conocía como akiyami, o fiebre de otoño. Anterior al reporte por parte de Weil surgieron descripciones de Leptospirosis icterica, debido a la introducción de *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae al occidente europeo en el siglo XVIII por la extensión del habitat de la rata de alcantarilla (*Rattus norvegicus*) hacia el oeste de Euroasia (Levett, 2001; Haake et al., 2010; Rodrigues et al., 2015).

La etiología de la leptospirosis fue demostrada independientemente en 1915 en Japón y Alemania. Inada e Ido (1915) en Japón detectaron ambas espiroquetas y anticuerpos específicos en la sangre de mineros con leptospirosis, y dos grupos de científicos germanos Hubener y Reiter, (1915); Uhlenhuth y Fromme, (1915) estudiaron en soldados alemanes, la enfermedad en la primera guerra mundial en frente occidental lo que fue convalidado después en Europa por trabajos realizados por el grupo de Inada (Levett, 2001; Rodrigues et al., 2015; Haake et al., 2010).

1.2. Descripción del género *Leptospira*.

El género *Leptospira* es una espiroqueta que mide cerca de 0.1 μm de diámetro por 6-20 μm de longitud. Incluye especies saprófitas y patógenas para éste género, Las espiroquetas de la especie *L. interrogans* tiene en sus extremos un parecido al signo de interrogación, nombrándola *Spirochaeta interrogans* (Levett, 2001; Rodrigues et al., 2015; Haake et al., 2010). Dos flagelos con inserción polar están localizados en el espacio periplasmático encargado del movimiento. Los lipopolisacáridos de las leptospiras tienen una composición similar a la de otras bacterias Gram negativas, pero con actividad endotóxica inferior. Son aerobios obligados con una temperatura óptima de crecimiento entre 28 a 30 °C y pH de 7,2-8; crecen en medios enriquecidos con vitaminas, ácidos grasos de cadena larga y sales de amonio.

Las leptospiras colonizan los túbulos renales proximales de animales “reservorios”, donde son capaces de replicarse y persisten a pesar de ser eliminadas constantemente en la orina (Levett, 2001; Alder et al., 2010; Rodrigues et al., 2015).

Las espiroquetas del género *Leptospira* se agrupan en dos clases saprófitas y patógenas. Las especies saprófitas se nutren de minerales presentes en el agua superficial o el barro,

mientras que las especies patógenas tienen un ciclo de vida que incluye las fases de infección animal y ambiental. Estas se han adaptado a la capacidad de sobrevivir en condiciones deficientes de nutrientes, pudiendo permanecer inmóviles durante meses en agua destilada (Barragan et al., 2011).

1.3. Taxonomía y Clasificación.

1.3.1. Taxonomía.

Leptospira interrogans serovar *hardjo* está clasificada dentro del orden Spirochaetales, familia Leptospiraceae conjuntamente con los géneros *Leptonema* y *Turneriella*, este último adscrito después de realizar la secuencia de rRNA 16s (Hovind-Hougen et al., 1981), como se describe en la figura 1.

Para *L. biflexa* se reconocen más de 60 serovares, mientras tanto *L. interrogans* contiene cerca de 260 serovares entre los cuales está el serovar Hardjo (Levett, 2001; Alder et al., 2010).

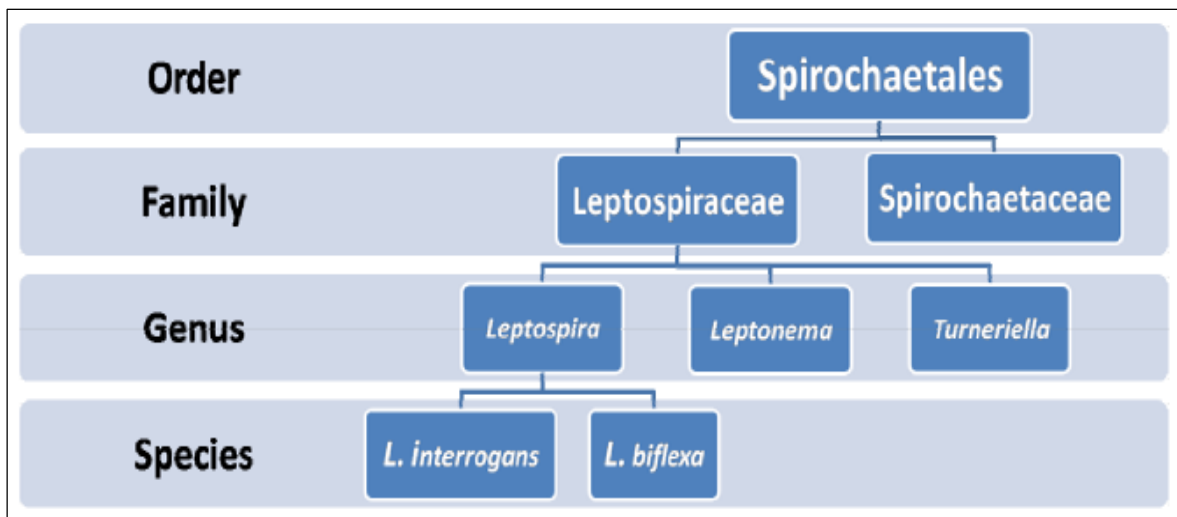


Figura 1. Taxonomía de género *Leptospira*.

Fuente: Levett, 2001; Subharat, 2010; Alder et al., 2010.

1.3.2. Clasificación serológica.

El sistema taxonómico basado en la serología se utiliza para dividir *Leptospira* en serovares basándose en los patrones de antígeno de superficie; tanto *L. interrogans* y *L. biflexa* se dividen en serotipos definidos por la prueba de Aglutinación-absorción cruzada (CAAT) con un antígeno homólogo, la heterogeneidad estructural de los lipopolisacaridos (LPS) además de similitudes genéticas (Subharat, 2010; Rodrigues et al., 2015). En esta clasificación el género *Leptospira* está dividido en numerosos serovares establecidos por CAAT (Ding et al., 1993; Kmety et al., 1993; Subharat, 2010; Djelouadji et al., 2012), en el cual, si más del 10% del título homólogo permanece en al menos uno de los dos antisueros, después de repetidas pruebas, estas cepas pertenecen a diferentes serotipos.

Los Serovares que son antigénicamente relacionados, se agrupan en serogrupos (Tabla 1). Se registra más de 200 serotipos agrupados en 28 serogrupos correspondientes a *Leptospira biflexa*, mientras tanto 23 serogrupos se reconocen para *Leptospira interrogans*, parásitas o patógenas tanto para humanos como para animales (Subharat, 2010; Zapata et al., 2010). Este grupo está compuesto de bacterias con diferentes adaptaciones ecológicas como la capacidad de vivir por largos periodos fuera del hospedador, entre otras.

Tabla 1. Serogrupos y algunos serovares de *L. interrogans*

Serogrupo	Serovar (s)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae, copenhageni, lai, zimbabwe
Hebdomadis	Hebdomadis, jules, kremastos
Autumnalis	Autumnalis, fortbragg, bim, weerasinghe
Pyrogenes	Pyrogenes
Bataviae	Bataviae
Grippotyphosa	Grippotyphosa, canalzonae, ratnapura
Canicola	Canicola
Australis	Australis, bratislava, lora
Pomona	Pomona
Javanica	Javanica
Sejroe	Sejroe, saxkoebing, hardjo
Panama	Panama, mangus
Cynopteri	Cynopteri
Djasiman	Djasiman
Sarmin	Sarmin
Mini	Mini, Georgia
Tarassovi	Tarassovi
Ballum	Ballum, aroborea
Celledoni	Celledoni
Louisiana	Louisiana, lanka
Ranarum	Ranarum
Manhao	Manhao
Shermani	Shermani
Hurstbridge	Hurstbridge

Fuente: Levett, 2001; Zapata et al., 2010; Haake et al., 2010

1.3.3. Clasificación genotípica.

La clasificación fenotípica fue reemplazada por la genotípica en la cual un número de genomoespecies se incluye todos los serovares de ambas especies. De acuerdo con técnicas de hibridación de DNA-DNA se han clasificado al género de *Leptospira* en 19 genomoespecies, divididas en patógenas (Tabla 2), tales son: *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *Lnoguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii*, *L. wolffii*. Las especies saprófitas incluyen: *L. biflexa*, *L.*

meyeri, *L. yanagawae*, *L. kmetyi*, *L. vanthielii*, *L. wolbachii*. Estas formaban parte de las genomoespecies 1, 3, 4, y 5 (Alder et al., 2010; Subharat, 2010).

Tabla 2. Genomoespecies de *Leptospira* y distribución de los serogrupos

Especie	Serogrupos
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae, Australis, Grippotyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes, Grippotyphosa, Ranarum, Louisiana, Mini, Sarmin
<i>L. noguchii</i>	Canicola, Pomona, Autumnalis, Pyrogenes, Louisiana, Bataviae, Australis, Shermani, Djasiman, Tarassovi
<i>L. santarosai</i>	Djasiman, Sejroe, Bataviae, Shermani, Hebdomadis, Tarassovi, Pyrogenes, Autumnalis, Bataviae, Mini, Grippotyphosa, Sejroe, Pomona, Javanica, Sarmin, Cynopteri
<i>L. meyeri</i>	Ranarum, Semarang, Sejroe, Mini, Javanica
<i>L. wolbachii</i>	Codice
<i>L. biflexa</i>	Semarang, Andamana
<i>L. fainei</i>	Hurstbridge
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica, Ballum, Hebdomadis, Sejroe, Tarassovi, Mini, Celledoni, Pyrogenes, Bataviae, Australis, Autumnalis
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa, Autumnalis, Cynopteri, Hebdomadis, Australis, Pomona, Djasiman, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Bataviae
<i>L. weilii</i>	Celledoni, Icterohaemorrhagiae, Sarmin, Javanica, Mini, Tarassovi, Hebdomadis, Pyrogenes, Manhao, Sejroe
<i>L. inada</i>	Lyme, Shermani, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, Manhao, Canicola, Panama, Javanica
<i>L. parva</i>	Turneria
<i>L. alexanderi</i>	Manhao, Hebdomadis, Javanica, Mini

Fuente: Levett, 2001; Alder et al., 2010; Subharat, 2010; Haake et al., 2010

La heterogeneidad genética para el género *Leptospira* en cuanto a especies como para serovares es amplia (Tabla 3) por los resultados obtenidos de varias investigaciones en las cuales se obtienen nuevas adiciones a este género (Levett, 2001).

Tabla 3. Serovares de *Leptospira* que se encuentran en varias especies.

Serovar	Especies
bataviae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i>
bulgarica	<i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i>
grippotyphosa	<i>L. kirschneri</i> , <i>L. interrogans</i>
hardjo	<i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. interrogans</i> , <i>L. meyeri</i>
icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. inadai</i>
kremastos	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i>
mwogolo	<i>L. kirschneri</i> , <i>L. interrogans</i>
paidjan	<i>L. kirschneri</i> , <i>L. interrogans</i>
pomona	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i>
pyrogenes	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i>
szwajizak	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i>
valbuzzi	<i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i>

Fuente: Levett, 2001; Haake et al., 2010

1.4. Estructura antigénica.

El género *Leptospira* tiene una típica estructura de doble membrana, constituida por la membrana citoplasmática y la pared celular de peptidoglucano estrechamente asociadas y recubiertas por una membrana externa (Cullen et al., 2004). Dentro de la membrana externa, el lipopolisacárido (LPS) constituye el principal antígeno de *Leptospira* y es estructuralmente e inmunológicamente similar a LPS de organismos Gram negativos; sin embargo, es relativamente no tóxico para las células o animales, siendo menos letal en comparación con *E. coli* LPS (Faine et al., 1999). De igual manera los lípidos de *Leptospira* contiene algunas características inusuales (Que-Gewirth et al., 2004) como una porción de disacárido de glucosamina modificada que es fosforilada y metilada. También existen proteínas estructurales y funcionales, además de los LPS formando parte de la membrana externa. Así mismo, una gran cantidad de estas proteínas son lipoproteínas con relativa abundancia en la superficie celular (Cullen et al., 2005). Las proteínas integrales de la membrana como la porina OmpL1 (Shang et al., 1995) y el sistema de secreción T2SS (Rodrigues et al 2005), se muestran como antígenos de *Leptospira* (Alder et al., 2010).

1.5. Respuestas inmunes innatas y adquiridas.

Las leptospirosis patógenas resiste la actividad bactericida, la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos, menos la presencia de anticuerpos específicos (Banfi et al, 1982; McGrath et al, 1984; Vinh et al., 1982). Varios estudios sugieren que las leptospirosis patógenas son capaces

de sobrevivir dentro de los macrófagos y de escapar posteriormente mediante la inducción de apoptosis a la célula (Merien et al., 1997). Esta capacidad se correlaciona con la virulencia. Se encontraron bacterias en el citoplasma de las células “**Vero**” no fagocíticas, con evidencia de endocitosis mediada por receptores (Merien et al., 1997). Barocchi et al. (2002) sugirieron que las leptospiras cultivadas pueden realizar transcitosis en monocapas de células MDCK, pero rara vez se encuentra intracelularmente, lo que lleva a los autores a etiquetar leptospira como un patógeno no intracelular. Sin embargo, esta conclusión debe ser confirmada mediante investigaciones en las que se trate la invasión/captación intracelular *in vivo*, además de establecer comparaciones celulares las cuales den resultados deseados (Levett, 2001).

Además de presentar características de resistencia, también posee estrategia de evasión inmune como: reducción antigénica, formación de biofilms que les ayudan a sobrevivir en medios ambientales para luego colonizar los huéspedes (Rodrigues et al., 2015).

1.6. Epidemiología.

La leptospirosis es probablemente la enfermedad zoonótica más extendida y frecuente en el mundo. Esta patología es reemergente a nivel mundial (Hartskeerl et al., 2011).

Los animales incluyendo los seres humanos, se pueden dividir en hospedadores de mantenimiento y hospedadores accidentales. La enfermedad se conserva en la naturaleza por la infección crónica de los túbulos renales de los huéspedes de mantenimiento, siendo en estos la infección endémica, se transfiere principalmente de una animal a otro por contacto directo incluyendo los seres humanos. Los pequeños mamíferos son los más importantes huéspedes de mantenimiento (Tabla 4), propagando la enfermedad a los animales domésticos de granja, perros y personas (Levett, 2001; Bharti et al., 2003). Varias especies de roedores pueden ser reservorios de serotipos distintos de igual forma diferentes animales domésticos son de mantenimiento; el ganado lechero alberga serovariedades de hardjo, Pomona, grippotyphosa entre otros; en cerdos se ha registrado: Pomona, tarassovi, Bratislava; las ovejas pueden albergar hardjo y Pomona; finalmente los perros albergan el serovar canicola (Bolin, 2000).

Tabla 4. Serovares prevalentes en animales silvestres y domésticos*

Especie	Serovar	Huésped Reservorio	Referencia
<i>L. interrogans</i>	Hardjo	Ganado, ciervo, ovejas.	Subharat 2010; Petrakovsky et al., 2014.
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Cerdo, vacas	Subharat 2010; Petrakovsky et al., 2014; Bharti et al., 2003
<i>L. interrogans</i>	Copenhageni	Rata de Noruega	Subharat 2010
<i>L. interrogans</i>	Ballum	Rata negra, Ratón, erizo	Subharat 2010
<i>L. interrogans</i>	Balcanica	Zarigüeya	Subharat 2010
<i>L. interrogans</i>	Tarassovi, pomona	Porcinos	Subharat 2010; Bharti et al., 2003
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae y Canicola	Ardillas, roedores	Petrakovsky et al., 2014; Grooms 2006
<i>L. interrogans</i>	Baires, Canicola, Copenhageni, pomona	Caninos	Petrakovsky et al., 2014; Bharti et al., 2003; Grooms 2006
<i>L. interrogans</i>	Canicola, Copenhageni	Ganado, porcinos	Petrakovsky et al., 2014
<i>L. interrogans</i>	Grippotyhosa	Ganado; marsupiales	Petrakovsky et al., 2014; Bharti et al., 2003
<i>L. interrogans</i>	Varilla	<i>Rattus norvegicus</i> y <i>Rattus rattus</i>	Petrakovsky et al., 2014
<i>L. interrogans</i>	Bratislava	Equinos, porcinos	Bharti et al., 2003; Grooms 2006
<i>L. interrogans</i>	Cynopteri, wolffi	Murciélagos	Bharti et al., 2003

*solo patógenas

Elaboración: El autor

La principal vía de contagio es usualmente por contacto directo o indirecto con la orina de animales infectados, además las leptospiras patógenas también se excretan en los productos de aborto (Ellis et al., 1985). Un ambiente cálido y húmedo es el medio idóneo en el que las bacterias patógenas sobreviven más tiempo (Hartskeerl et al., 2011).

La infección principalmente se produce a través de las membranas mucosas o daños en la piel; sin embargo la infección puede ocurrir cuando se está inmerso por tiempo prolongado en el agua. La inhalación de aerosoles también son un medio de contagio al igual que la vía hematógica (Levett, 2001).

La ocupación profesional es un riesgo significativo para el contagio a los seres humanos puesto que el contacto directo con animales infectados representa la mayoría de las infecciones en los agricultores, veterinarios y trabajadores de mataderos, mientras tanto el contacto indirecto produce la infección en: acuicultores, guardabosques, trabajadores de canales de riego y personal de mantenimiento de aguas servidas (Alder et al., 2010; Levett 2001; Barragan et al., 2011).

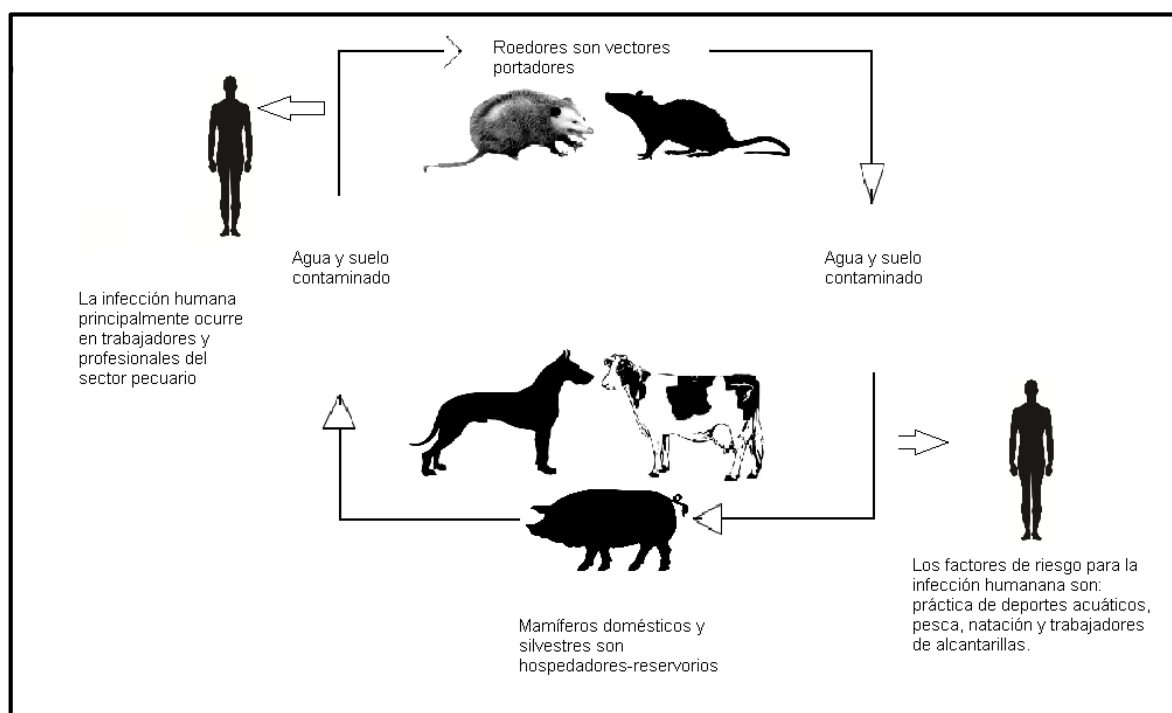


Figura 2. Epidemiología de la leptospirosis.

Elaboración: El autor

1.7. Patología y lesiones en el hospedador.

La leptospirosis se caracteriza por el desarrollo de vasculitis, daño endotelial e inflamación en diferentes órganos y a menudo hay presencia de petequias en áreas extensas y decoloración según el grado de ictericia (Areaín et al., 1962; Pierce et al., 1997). Los órganos afectados son: el hígado, los riñones, el corazón y los pulmones; el sistema urinario es el más afectado a nivel intracelular, observándose en los túbulos renales las bacterias (Zaki et al., 1998).

Algunas lesiones patológicas en el corazón incluyen miocarditis intersticial, petequias, infiltración mononuclear en el epicardio, pericárdico y arteritis coronaria. En los pulmones generalmente hay congestión, hemorragia, septos alveolares en estos se observan leptospiras. Los daños en los músculos esqueléticos específicamente en las extremidades inferiores se observa necrosis focal de las fibras musculares, infiltración de histiocitos, neutrófilos y células plasmáticas correlacionándose con mialgias en pacientes (Levett 2001; Bharti et al., 2003).

Debido a sus manifestaciones proteicas la leptospirosis puede confundirse con otras patologías tanto en seres humanos como en animales por lo que es importante realizar un diagnóstico diferencial (Hartskeerl et al., 2011).

1.8. Leptospirosis en animales.

Varios síntomas de la enfermedad, pueden ocurrir debido a las interacciones entre la adaptación, la virulencia de los serotipos y el estado inmunológico del hospedador. El desarrollo de esta patología ocurre dependiendo del agente infectante cuando es por un serotipo hospedador adaptado los signos clínicos son generalmente agudos. Sí la infección es por un serotipo no hospedante adaptado los signos clínicos pueden variar de un estado agudo a crónico. La incidencia mayor de casos graves se presenta en animales jóvenes (OIE, 2014).

1.8.1. Leptospirosis aguda.

Los síntomas de esta enfermedad en fase aguda por lo general comienzan con temperaturas elevadas conjuntamente con la anorexia, agalactia, meningitis, anemia hemolítica, hematuria, hemoglobinuria, ictericia, fallos renales todo este puede provocar la muerte. Los animales recuperados de la leptospirosis suelen tener tasas de crecimiento pobres y lesiones renales notorias (OIE, 2014).

1.8.2. Leptospirosis crónica.

La fase crónica de la leptospirosis se distingue por: abortos, muerte fetal, crías débiles, nefritis intersticial crónica, desempeño reproductivo y crecimiento deficiente. La presencia de leptospiras en el riñón y en el tracto genital de los machos y las hembras son dos signos microbiológicos crónicos importantes de la infección que también son problemas de diagnóstico. Los animales infectados crónicamente pueden ser portadores durante toda la

vida y servir como reservorios de la enfermedad para otros animales (Subharat, 2010; FAO 2008; OIE, 2014).

La infección crónica por *Leptospira* en ganado bovino refleja importancia por las pérdidas económicas generadas por sus efectos en los parámetros reproductivos. Esto se manifiesta con las cifras de abortos en Venezuela 40,8% e Irlanda con 49,7% causados por el serotipo Hardjo (Ochoa et al., 2000).

Tabla 5. Seroprevalencia de *Leptospira hardjo* en bovinos en países de América

País	Prevalencia %	Referencia
Brasil	38,3	Martins y Lilenbaum (2013)
Chile	16,9	Salgado et al.(2014)
México	33,1	Méndez et al.(2013)
Venezuela	38,1	Alfaro et al. (2004)
Colombia	20,8	Betancur et al.(2013)
Estados Unidos	35-50	Grooms.(2006)
Perú	35	Rivera et al.(2004)

Elaboración: El autor.

*Datos corresponden a regiones de esos países.

1.9. *Leptospira* en humanos.

La leptospirosis es una de las infecciones zoonóticas más comunes, presente en todas las regiones del mundo excepto la Antártida. Generalmente se la relaciona con ciertas condiciones socioeconómicas o climáticas que favorecen al contagio de animales vectores y la exposición humana, además de ser reconocida como un problema de salud pública.

Un estudio realizado por Pappas et al., (2008) en el cual se evaluaron las tendencias de leptospirosis anual para distintos países determinaron que la endemicidad de esta enfermedad en humanos se encuentra principalmente en el sudeste de Asia y Oceanía así como en el Caribe, Centro y Sur América.

Entre las naciones de América del Sur (Tabla 6) con alta prevalencia son: Uruguay con una incidencia anual de 25 por millón de población, Brasil con una ocurrencia anual de 12.8 por millón de población, Ecuador con un evento anual de 11.6 por millón de población, Argentina con una prevalencia de 9.5 por millón de población (anual), entre los países de menor incidencia de leptospirosis en humanos están Venezuela y Colombia con 3.8% y 1,6% respectivamente. (Pappas et al., 2008).

La presencia de esta infección en el Ecuador se ha reportado en la región amazónica con un 13.2% de positividad en el diagnóstico realizado a pacientes febriles (Manock et al., 2009). Otra publicación realizada en la región costera ecuatoriana reportan 11.1% de positividad para leptospira (Gamboa et al., 2013). Además se reporta el aislamiento de cepas de leptospira en ríos de la selva ecuatoriana (Barragan et al., 2011).

En mayor riesgo de contagio están: trabajadores de laboratorios, veterinarios, personal de mataderos, agricultores, acuicultores y personal de mantenimiento de alcantarillas. Además de personas vinculadas a deportes extremos acuáticos.

Tabla 6. Incidencia anual de leptospirosis humana en América y otros países.

Naciones con alta incidencia		Otras naciones	
Nación	Incidencia anual por millón de población	Nación	Incidencia anual por millón de población
Seychelles	432,1	Bielorrusia	3,4
Trinidad y Tobago	120,4	Bulgaria	3,7
Barbados	100,3	Chile	1,6
Jamaica	78	Colombia	1,6
Costa Rica	67,2	República Checa	1,8
Sri Lanka	54	Francia	3,9
Tailandia	48,9	Alemania	0,7
El Salvador	35,8	Grecia	3
Nueva Zelanda	26	Honduras	3,1
Uruguay	25	Hungría	3,1
Cuba	24,7	Irlanda	2,2
Nicaragua	23,3	Italia	0,7
Croacia	17,3	Lituania	2,2
Rusia	17,2	México	1
Ucrania	15,3	Países Bajos	1,9
República Dominicana	13,8	Panamá	1,3
Brasil	12,8	Paraguay	1,9
Ecuador	11,6	Serbia y Montenegro	1,5
Argentina	9,5	Singapur	2
Rumania	9,4	Corea del Sur	2,8
Australia	8,9	España	0,3
Portugal	6,8	Reino Unido	0,6
Dinamarca	6	USA	0,1
Letonia	5,6	Venezuela	3,8
Eslovenia	5,4		

Fuente: Pappas et al., 2008

1.9.1. Manifestaciones clínicas.

a. Leptospirosis aguda.

En esta fase temprana los primeros síntomas son fiebre, escalofríos, dolor de cabeza severo, mialgias, náuseas, vómitos, malestar e hiperemia conjuntival (Sanders 1999; World Health Organization, 2001, 2003; McBride, 2005; Vijayachari et al., 2008; Seguro et al., 2013).

b. Leptospirosis crónica.

En esta fase las manifestaciones clínicas incluyen: fiebre, ictericia, insuficiencia renal, miocarditis, uveítis, meningitis y hemorragia pulmonar letal cuyo desenlace es un fallo multiorgánico, necrosis hepatocelular y hepatomegalia (Faine et al., 1999; Faisal et al., 2012; Dolhnikoff et., 2007; Seguro et al., 2013;). En esta fase a nivel mundial las tasas de mortalidad varían entre 3 y >50% (World Health Organization 2003, 2001; McBride 2005). La insuficiencia renal es la principal causa de muerte. Los signos renales pueden incluir piuria, albuminuria, hematuria y cilindros granulares (Rodrigues et al., 2015).

La ictericia grave se observa generalmente 4-6 días después de la infección, aunque éste síntoma se puede observar en un rango de tiempo que va entre el segundo día hasta máximo 2 a 3 semanas desde la infección.

1.9.2. Impacto económico

La leptospirosis está entre las enfermedades infecciosas que tienen impacto en problemas reproductivos en bovinos, especialmente *Leptospira hardjo* causante de abortos y por consiguiente la disminución en la producción de leche y venta de crías, teniendo implicaciones económicas importantes (Grooms, 2006).

Aparte de los problemas anteriormente mencionados se incluyen: los costos de tratamiento; los costos de empleo de profesionales en salud animal y humana. En el estudio realizado (Tabla 7) por parte del Gobierno de Queensland–Australia a través de su Departamento de Agricultura y Pesca, determinaron que el costo anual de vacunación es de 145,60 dólares anuales para prevenir leptospirosis, en un hato de 100 vacas, 3 toros, 25 novillas y 40 terneras de reemplazo (Department of Agriculture and Fisheries, 2010).

Tabla 7. Costo de vacunación en Australia

Variable	Cantidad	Unidad
Costo dosis	0,7	Dólares
Dosis requeridas	208	Anualmente
Costo anual	145,6	Dólares

Elaboración: El autor

1.10. Diagnóstico.

El diagnóstico para determinar la infección por leptospira, es muy importante debido a la gravedad de la enfermedad. En muchas ocasiones ha sido subestimada provocando muertes innecesarias en países subdesarrollados y del primer mundo.

Para ello se debe tomar en cuenta los siguientes métodos de diagnóstico:

1.10.1. Análisis serológicos

Las pruebas serológicas constituyen el procedimiento de laboratorio utilizado con más frecuencia para confirmar el diagnóstico clínico, determinar prevalencia en el rebaño y realizar estudios epidemiológicos. Los anticuerpos aparecen a los pocos días del comienzo de la enfermedad y persisten durante semanas o meses en algunos casos, años (OIE, 2008).

La presencia de anticuerpos IgG anti- *Leptospira* nos proporciona información de una infección previa. Los valores de punto de corte utilizados en el diagnóstico de *Leptospira hardjo* mediante ELISA son dados por los proveedores del kit comercial (OIE, 2008).

Entre las opciones de pruebas serológicas que muestran grados variables de especificidad de serogrupo y de serotipo, que contribuyen al diagnóstico veterinario son: la prueba de aglutinación microscópica (MAT) y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), recomendados en el comienzo de la fase inmunológica (OIE, 2008; Alder et al., 2010; Rodríguez et al., 2015).

Las evidencias serológicas y signos de la enfermedad son necesarias para establecer la fase de la infección. Las muestras obtenidas de fluidos corporales u órganos internos como: el riñón, hígado, pulmón, cerebro y glándulas adrenales, positivos al diagnóstico es concluyente de una leptospirosis aguda o, en el caso de un feto, de la infección crónica de la madre. Para el diagnóstico crónico de la enfermedad se confirma con la presencia de leptospiras en la orina, el riñón y en el tracto genital de animales sin síntomas clínicos (OIE, 2008).

a. MAT (prueba de aglutinación microscópica)

La prueba de aglutinación microscópica (MAT) se inicia con el cultivo de cepas seleccionadas (por ejemplo EMJH) a $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Este cultivo debe ser de al menos 4 días de edad a máximo 8 días. Para ser utilizados como antígenos la densidad es de aproximadamente 2×10^8 bacterias/ml. El recuento se realiza mediante una cámara de recuento bacteriano y microscopía de campo oscuro. Independiente del método utilizado para el conteo sea indirecto o directos deben correlacionarse con las lecturas específicas del instrumento en uso. Después se determina el número de antígenos que se utilizará. Seguidamente un volumen de cada antígeno, igual al volumen de suero diluido, se añade a cada pocillo, siendo la dilución final del suero 1/100 en la prueba de detección. Luego se procede a incubar las placas de microtitulación a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 1,5-4 horas. Las placas son examinadas por microscopía de campo oscuro (OIE, 2014).

El punto final se define como la dilución de suero que muestra 50% de aglutinación, dejando a las células 50% libres en comparación con un cultivo de control diluido $\frac{1}{2}$ en tampón fosfato salino. El resultado de la prueba puede ser reportada como la dilución de punto final de suero por ejemplo, 1/100 o 1/400 (OIE, 2014).

La identidad de los antígenos es un factor crucial en la realización de la MAT. Estos deben ser evaluados utilizando suero hiperinmune de conejo obteniendo según el protocolo propuesto por el subcomité de taxonomía de *Leptospira* (OIE, 2014).

b. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

Esta técnica es ampliamente utilizada en estudios epidemiológicos y determinación de prevalencia por ser altamente sensible y específica a un serotipo (OIE, 2008). Este ensayo es preferible al MAT para el diagnóstico veterinario, porque es conveniente para la proyección a gran escala, presentándose como una técnica fiable y eficiente. En el ELISA indirecto, las muestras de suero o leche se agregan a los pocillos de una placa de microtitulación, la cual está recubierta con antígeno inactivado. Los anticuerpos dirigidos contra *Leptospira hardjo* presentes en la muestra, se unen al antígeno durante la incubación y se detectan con un anticuerpo anti-inmuglobulina bovina conjugado con peroxidasa. El exceso de reactivos y soluciones se elimina mediante lavado después del tiempo de incubación. Para visualizar el conjugado unido se incuban las muestras con la solución de sustrato cromógeno. Finalmente, el color se mide mediante el espectrofotómetro. El desarrollo del color es proporcional a la

cantidad de antiglobulina ligada a la enzima que se haya captado, la cual a su vez será proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en el suero que se está analizando.

1.10.2. Técnicas de diagnóstico molecular.

El diagnóstico de leptospirosis requiere de ensayos capaces de detectar un pequeño número de leptospiras y que puedan realizar rápidamente para un tratamiento más eficaz. Para estudios epidemiológicos es necesario una metodología sensible y que permita el análisis de varias muestras procesadas simultáneamente. Técnicas basadas en ADN se han introducido en la investigación de leptospirosis como: hibridación del ADN, PCR y PCR en tiempo real (Subharat, 2010).

a. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

La técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) destaca su alta sensibilidad y rapidez para la detección de leptospiras en tejidos y fluidos corporales de animales. La variante PCR en tiempo real es más rápida que la PCR normal y menos sensible a la contaminación (Picardeu, 2013).

Los ensayos se dividen en dos categorías: el primero se basa en la detección de genes conocidos de bacterias; el segundo se basa en la detección solamente de genes de leptospiras patógenas (Thaipadunpanit et al., 2011). Estas técnicas no identifican el serotipo infectante, aunque grupos de cebadores pueden permitir una mayor identificación de la especie a nivel cepa si se secuencian los amplicones de PCR. Este nuevo análisis no es un método de diagnóstico de rutina, debido a la deficiencia de cebadores utilizados en las pruebas de muestras provenientes de animales. La validación del protocolo es un punto débil entorno al uso de PCR en el diagnóstico de leptospirosis en animales (OIE, 2014; Subharat, 2010).

La PCR ha demostrado ser una técnica sensible y rápida. Se trata en la amplificación enzimática *in vitro* de una secuencia de ADN diana a través de una serie de polimerizaciones llevadas a cabo por una ADN polimerasa termoestable. La especificidad del ensayo se puede ajustar por la elección del fragmento de ADN corto (oligonucleótido) llamado “cebador” para ello se diseñaron cebadores a partir del ADN del serovar Hardjo cuyo propósito es detectar leptospiras en la orina del ganado.

Posteriormente se mejoró el método de extracción de ADN con resultados de 5 a 10 leptospiras/ml. En otro caso con cebadores a partir del gen 16S rRNA del serovar canicola

llegando a detectar hasta 10 células de leptospira en la orina. Sin embargo en algunos estudios no se pudo diferenciar entre leptospira patógenas y saprófitas (Subharat, 2010).

1.10.3. Pruebas de inmunofluorescencia.

Estas pruebas se emplean para identificar la presencia de un antígeno en una muestra de tejido. El colorante fluorescente más utilizado para este tipo de prueba es el isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*, FITC). Este compuesto se conjuga de manera rápida con las inmunoglobulinas, sin afectar su reactividad. Cuando se irradia con luz ultravioleta no visible, el FITC remite una luz visible de color verde. Las inmunoglobulinas marcadas con FITC se utilizan en las pruebas directas e indirectas de anticuerpos fluorescentes. Los anticuerpos marcados con FITC se usan en pruebas de inmunofluorescencia directa e indirecta (Tizard, 2009).

a. Prueba directa de anticuerpos fluorescentes.

En esta técnica primero se marca el anticuerpo con FITC, el corte o frotis que contenga el microorganismo se fija en un portaobjetos, se incuba con el antisuero marcado y se lava para eliminar cualquier anticuerpo no unido. Al iluminarlo en un microscopio de campo oscuro con una luz ultravioleta, el microorganismo unido junto con el anticuerpo marcado presentará un brillo fluorescente. Esta prueba se puede utilizar en un número bajo de bacterias, además de virus (Tizard, 2009).

b. Prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes.

Esta prueba se puede utilizar para detectar anticuerpos en el suero o para identificar antígenos específicos en los tejidos. Para medir los niveles de anticuerpos, se emplea el antígeno presente en una muestra (frotis, cultivo celular, corte de tejido), fijándolo en un portaobjetos. Posteriormente se incuba juntamente con suero en el cual se cuantificará los anticuerpos presentes. Seguidamente se realiza el lavado. Estos anticuerpos se observan por la antiglobulina marcada con FITC. Esta técnica tiene dos ventajas sobre el ensayo de inmunofluorescencia directa: 1) varias moléculas de antiglobulinas marcadas pueden unirse a cada molécula del anticuerpo. 2) También se puede determinar la clase del anticuerpo específico, cuando se utiliza antiglobulina específicas (Tizard, 2009).

Tabla 8 Métodos de ensayo disponibles para el diagnóstico de la leptospirosis y su propósito.

Método	Propósito					
	Población libre de infección	Animal libre de infección antes de la epidemia	Contribución a las políticas de erradicación	Confirmación de casos clínicos	Prevalencia de infección – vigilancia	Estatus individual de animales o poblaciones postvacunación
Identificación del Agente						
Aislamiento e identificación	-	+++	-	+++	-	-
PCR	-	++	-	++	-	-
Detección de la respuesta inmune						
MAT	-	+++	-	++	+++	-
ELISA	+++	-	+++	+++	++	+++
Inmunofluorescencia	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Fuente: Adaptado de OIE, 2014

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método adecuado; + = puede ser utilizado en algunas situaciones, pero el coste, fiabilidad, u otros factores limita severamente su aplicación; – = no es apropiado para Este propósito; NV =no hay datos.

Aunque no todas las pruebas de las categorías +++ o ++ se han sometido a la validación formal, su naturaleza rutinaria y el hecho de que se han utilizado ampliamente sin resultados dudosos, las hace aceptables.

1.11. Medidas de prevención y profilaxis.

Las vacunas contra leptospirosis deben ser suspensiones inactivadas de una o más cepas patógenas de tal manera que se conserve la actividad inmunogénica. Las vacunas no eliminan la infección de un huésped infectado por lo que se recomienda un programa sanitario preventivo. Productos monovalentes han demostrado la producción clínica y microbiológica de anticuerpos durante años, al contrario de un producto multivalente cuya estimulación inmune es deficiente.

En la mayoría de los casos; las vacunas proporcionan una protección significativa contra la enfermedad producida en condiciones similares a la de campo. La inmunidad de la vacuna debe persistir durante al menos 6 meses o más. Inyecciones comerciales disponibles para el tratamiento de esta infección tienen los principios activos como: la dihidroestreptomicina en dosis de 5 mg/kg de peso vía I. M por 5 días o 25 mg/kg de peso en una sola aplicación. También se utiliza la asociación de penicilina y estreptomicina u oxitetraciclina.

La inyección debe administrarse siguiendo las recomendaciones del fabricante y mantener la cadena de frío (OIE, 2014).

CAPÍTULO II
DISEÑO METODOLÓGICO

La investigación se realizó con sueros bovinos previamente obtenidos, los cuales reposan en el banco de sueros del Laboratorio de Sanidad Animal y Zoonosis del Departamento de Ciencias Agropecuarias y de Alimentos de la Universidad Técnica Particular de Loja. La determinación del tamaño de la muestra y la obtención de las mismas se llevó a cabo según la metodología utilizada por Saa et al. (2011).

2.1 Población de estudio.

El estudio fue realizado en explotaciones bovinas de aptitud láctea y mixta situadas en las principales provincias productoras de leche bovina de Ecuador siendo; Pichincha, Sto. Domingo de los Tsáchilas, Manabí, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Azuay, y Zamora Chinchipe; estas provincias contienen el 62% de los colectivos Unidades de Producción Agropecuaria (UPA's) del país y producen más del 64% del total nacional de leche (III Censo Nacional Agropecuario Ecuador-Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, Ministerio de Agricultura y el Servicio de Información y Censo Agropecuario INEC-MAG-SICA, 2010).

El muestreo se realizó en tres etapas: la primera mediante muestreo estratificado por provincias, con objeto de que la muestra obtenida por provincia sea proporcional del censo total. En una segunda etapa, dentro ya de cada provincia, se realizó un muestreo por conglomerados. Para ello, se dividió cada provincia en cuadrantes de cinco kilómetros cuadrados, considerándose cada cuadrícula resultante como un conglomerado.

Seguidamente, se eligieron de forma completamente aleatoria los cuadrantes o conglomerados de cada provincia en los que sería realizado el muestreo. Dentro de cada conglomerado, se visitaron y tomaron muestras de todas las explotaciones delimitadas por el cuadrante. Finalmente, en cada explotación los individuos a muestrear se eligieron mediante muestreo aleatorio simple, incluyendo todos los animales mayores de seis meses (Thrusfield, 2007).

El período de muestreo se llevó a cabo entre los meses de junio de 2008 y febrero de 2009 para 7 provincias y en el 2010 para la provincia de Zamora Chinchipe.

2.2 Determinación del tamaño de la muestra.

Para el cálculo del tamaño de la muestra se recurrió al programa informático de Epidemiología Veterinaria WinEpiscopo 2.0, de libre acceso y desarrollado por el gobierno de Aragón en colaboración con las Universidades de Zaragoza, la Universidad de Wageningen y la Universidad de Edinburgo.

WinEpi Working in Epidemiology

Sobre WinEpi | Colaboradores | Contáctenos | Español

Tamaño de muestra 3 **Tamaño de muestra: Estimar media (Distribución Normal)**

Detectar enfermedad (muestreo aleatorio y diagnóstico perfecto)
 Estimar media (Distribución Normal)
 Estimar media (Distribución de Poisson)
 Estimar proporción (muestreo aleatorio y diagnóstico perfecto)
 Diferencia entre proporciones
 Método de muestreo
 Diagnóstico
 Medidas de enfermedad
 Estudios observacionales
 Estadística básica

Datos disponibles

Introduzca los siguientes datos para determinar el tamaño de muestra mínimo necesario para estimar una media de una variable cuantitativa asumiendo que sigue una distribución Normal:

Nivel de confianza: 95%
 Tamaño de la población: 4486020
 Desviación estándar esperada: 50
 Error absoluto aceptado: 5

Volver Seguir

Resultados

Para poder calcular la media de una determinada variable cuantitativa, con una desviación estándar estimada de 50 , un nivel de confianza del 95% y un margen de error de 5, en una población de 4486020 individuos debemos tomar una **muestra de 385 individuos**.

Tamaño de muestra sin ajustar: 385
 Fracción de muestreo sin ajustar: 0%
 Tamaño de muestra ajustado: 385
 Fracción de muestreo ajustado: 0%

Ayuda básica

Cuando nos planteamos calcular la media de una variable cuantitativa en una población, debemos tener en cuenta el tamaño de muestra necesario para obtener un valor significativo de esa media. El tamaño de la muestra dependerá de la desviación estándar prevista (que determina la heterogeneidad o variabilidad del valor en la población), de la precisión deseada o error absoluto esperado con respecto de la media y el nivel de confianza.

Existen dos fórmulas para calcular el tamaño de la muestra dependiendo de si es conocido el tamaño de la población estudiada (N).

Figura 3: Muestreo con WinEpi 2.0
 Elaboración: El autor.

Según datos del INEC-MAG-SICA (2010) el censo total de bovinos en Ecuador se estima en 4.486.020 animales en 806.856 UPA's. Con objeto de obtener el tamaño de muestra preciso para el cálculo de la dispersión o prevalencia por explotaciones, se usó una prevalencia de esperada del 65%. Con este dato, un error admitido del 5% y un nivel de confianza del 95%, se obtuvo un tamaño de muestra de 386 explotaciones.

Se usó una prevalencia intrarrebaño del 35% (según estudios no publicados), con lo cual por explotación se tomó un tamaño de muestra de ocho animales, independientemente del tamaño de la misma. En explotaciones en donde el número de animales mayores de seis meses era menor a ocho se tomaron menos muestras, y de todos los animales de la explotación. Recolectando un total de 2668 muestras de sangre bovina.

Para el estudio se utilizó una muestra con una prevalencia esperada de 50%, un intervalo de confianza del 95% y un error aceptable del 5%, habiendo obtenido un total de 385 explotaciones para ser muestreadas. En Ecuador no existe un sistema de identificación, por lo que se utilizó el siguiente sistema de muestreo:

- a. Un muestreo estratificado donde cada estrato es una provincia. El total de explotaciones corresponde al 100%. Se hizo una relación en base al número total de cada estrato versus el número total de explotaciones en las provincias muestreadas.
- b. Las provincias fueron divididas en cuadrantes de veinticinco kilómetros cuadrados. Para ellos se utilizó las coordenadas UTM para la división. Los bloques para el muestreo se escogieron de manera randomizada.
- c. Todas las explotaciones del primer bloque fueron muestreadas (a excepción de aquellas donde se vacunaba contra leptospira) debido al desconocimiento del número de explotaciones por bloques. En el segundo bloque y los siguientes se fueron muestreando hasta obtener el número completo por cada provincia.
- d. En cada explotación se seleccionó únicamente animales mayores de seis meses. Dentro de cada explotación se seleccionó un mínimo de 11 animales dentro de cada explotación. La muestra fue calculada nuevamente en el programa WinEpiscope2.0 tomando en cuenta una prevalencia intrarrebaño de 50% (based on preliminary studies), con un tamaño de rebaño de 1000 animales siendo el más grande en Ecuador. Un nivel de significancia del 95%. Todos los animales incluidos en este estudio no fueron lesionados ni maltratados y las muestras se tomaron según farm animal ethic regulations. No se requirió aprobación ética a las autoridades de Ecuador.

2.3 Obtención y procesado de las muestras de sangre.

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción en la vena coccígea (base de la cola). Se utilizaron tubos vacutainer de 10 ml con sus respectivas agujas. Tras la coagulación, se procedió a la separación del suero, centrifugado a 2.000 rpm durante 10 minutos. El suero fue dispensado en tubos de reacción marca Eppendorf, que fueron identificados en una plantilla mediante una clave numérica, y posteriormente se congelaron a -25°C hasta el momento del análisis.

2.4 Análisis serológico ELISA.

El análisis serológico se realizó empleando un kit comercial (PrioCHECK® L. hardjo Ab). Es un ELISA indirecto que detecta anticuerpos contra *Leptospira hardjo* sea en suero o leche de bovinos. El protocolo establecido se siguió estrictamente el cual se describe en el ANEXO 1.

Materiales y equipos utilizados en el ensayo ELISA se describen en la tabla correspondiente al ANEXO 2.

2.5 Descripción de las variables.

Describiremos las variables levantadas mediante la encuesta aplicada

2.5.1 Variables de localización:

Provincia, cantón; esta información nos indica donde se tomó las muestras para el estudio.

2.5.2 Variables relacionadas con las características de las explotaciones:

Antigüedad de la finca, aptitud de la granja, raza, tamaño de la unidad productiva y tipo de producción.

2.5.3 Variables relacionadas con las instalaciones:

Ventilación, limpieza, sala de ordeño, establos, manga de manejo, tipo de cama, cercas, división de potreros, presencia de vados (sistemas de desinfección).

2.5.4 Variables relacionadas con la reproducción:

Tipo de reproducción y sincronización de partos.

2.5.5 Parámetros relacionados con los animales:

Raza (criollo, mestizo, pura sangre), sexo y edad.

2.6 Análisis de datos.

Para los datos obtenidos del ensayo ELISA se creó una base en Excel Office con la finalidad de tabular y analizar. El análisis y determinación de prevalencia y dispersión de *Leptospira hardjo* se realizó mediante el programa SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), en el cuál se realizó un análisis de tipo descriptivo (univariante).

	Altura	Cantigu	Aplit	Criollo	Mestiz	Canimal	Chembo	Cterne	Ctamañot	Ctamañ	Cpend	Limp	División	Monta	Mont	Ins	Sincro	desv	cedad	Cdestet	Calost	Usolech	Ad libit	Alimentaci	Balan	Past	Supl
1	2441.66	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	2	1	2	1	2	1	1	1	1	
2	2858.31	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	1	1	2	2	1	1	1	2	1	
3	2715.92	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	1	2	
4	2707.95	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	1	1	2	2	1	2	1	2	1	
5	2713.67	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	2	
6	2734.04	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	2	
7	2645.26	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1	1	1	2	
8	2800.00	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	2	
9	2820.00	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	
10	2835.00	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	1	2	1	1	1	1	1	2	2	1	2	
11	2800.00	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	1	1	1	2	
12	2822.12	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	2	1	2	1	2	1	1	1	2	
13	2813.00	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	
14	2800.00	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	1	1	2	1	2	1	1	1	2	
15	2875.15	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	2	
16	2859.18	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	2	
17	2806.34	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	1	1	1	2	
18	2815.00	1	1	2	1	2	2	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1	
19	2806.00	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1	2	
20	2828.48	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	1	2	2	1	2	1	1	2	1	1	
21	147.33	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	1	2	2	1	2	1	2	1	1	1	1	
22	186.02	1	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	1	1	1	2	
23	71.97	1	2	2	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	
24	80.46	1	2	2	1	1	1	2	1	1	2	2	1	2	1	2	2	2	1	2	2	1	1	1	1	1	
25	3020.00	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2	
26	2800.00	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	1	1	2	
27	2845.00	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1	
28	2800.00	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2	1	1	1	1	1	
29	2815.00	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	
30	2821.00	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	2	2	1	2	1	1	1	1	1	2	
31	2817.00	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	

Figura 4. Programa estadístico Spss 15. 0.
Elaboración: El autor.

2.6.1 Análisis estadístico descriptivo (univariante).

En las variables nominales se determinó la distribución de frecuencias de cada categoría. Para las variables de diagnóstico serológico mediante la distribución de frecuencias, se determina directamente la dispersión y prevalencia de la infección (Saa et al., 2011).

El análisis descriptivo de este tipo de variables se fijó la distribución de frecuencias de cada una de las categorías (Thrusfield, 2007).

2.7 Diseño de mapas coropléticos.

Los mapas fueron diseñados en el programa gvSIG 2.00 según los resultados de dispersión y prevalencia individual de *Leptospira hardjo* ya obtenidos.

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un exitoso programa de erradicación de enfermedad en este caso de leptospirosis, requiere estudios epidemiológicos para evaluar la prevalencia y estado de la enfermedad en los hatos bovinos, además de contribuir al conocimiento de esta enfermedad, en el mundo (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010; OIE 2014).

3.1 Seroprevalencia aparente de *Leptospira hardjo* en Ecuador.

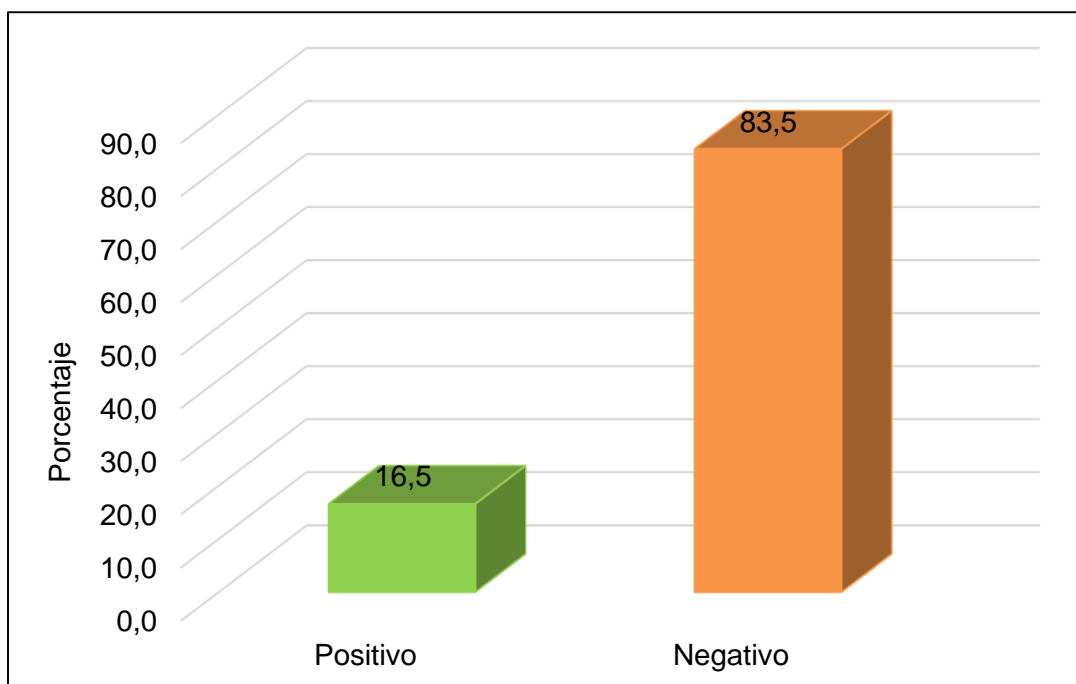


Figura 5. Seroprevalencia de *Leptospira hardjo* en bovinos de Ecuador.
Elaboración: Maza, 2015.

Después de analizar serológicamente 2668 muestras de bovinos de aptitud lechera y doble propósito, obtuvimos como primer resultado una prevalencia aparente de 16,5% (CI₉₅) de leptospirosis como se observa en la figura 5. Otro resultado obtenido fue la prevalencia intrarrebaño la cual varía entre 0%-66,67% con una media de 9,5%.

Este reporte de seroprevalencia de *Leptospira hardjo* se encuentra dentro del rango (16,9%-50%) para *Leptospira hardjo* en ganado bovino correspondiente a países de América (Martins y Lilenbaum., 2013; Martins et al., 2012; Salgado et al., 2014; Mèndez et al., 2013; Alfaro et al., 2004; Betancur et al., 2013; Rivera et al; Grooms, 2006).

Comparado con el resto de países de la región se podría considerar una prevalencia baja pero posiblemente una alta frecuencia de leptospirosis dado que en este estudio únicamente se determina la prevalencia del serovar hardjo. Este valor coincide con el reporte de Salgado et

al., 2014 obteniendo 16,9% de prevalencia para podría *Leptospira hardjo*. Esto podría ser debido a que la leptospirosis es más frecuente donde las condiciones climáticas son adversas y el ganado infectado actúa como reservorio, además de las prácticas de bioseguridad deficientes, lo cual conlleva a un mayor riesgo de infección y la perpetuación del agente infeccioso.

3.2 Seroprevalencia real de *Leptospira hardjo* en Ecuador.

La prevalencia real corresponde al porcentaje de individuos positivos al análisis serológico considerando la sensibilidad y especificidad de la prueba PrioCHECK® L. hardjo Ab utilizado.

Con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 96,8% se obtuvieron los siguientes resultados

$$Prevalencia\ real = \frac{\% Prevalencia + Especificidad - 1}{\%Sensibilidad + Especificidad - 1}$$

$$Prevalencia\ real = \frac{0,65 + 0,968 - 1}{1 + 0,968 - 1}$$

$$Prevalencia\ real = 13,7\%$$

Para la comprobación de los resultados, se utilizó el programa en línea Win Epi (2015), con los mismos datos de la fórmula, obteniendo los siguientes resultados:

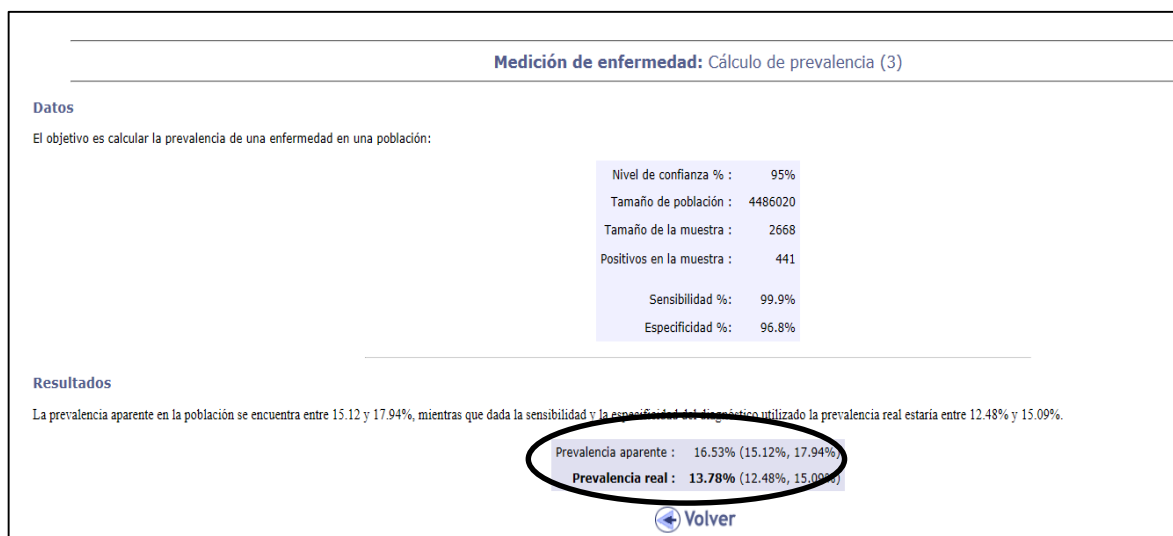


Figura 6: WinEpiScope 2.0
Elaboración: El autor.

Los resultados son idénticos a los aplicados con la fórmula estadística para cálculo de prevalencia real.

3.3 Seroprevalencia de *Leptospira hardjo* por aptitud.

Como se muestra en la figura 7 la prevalencia de *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*, es mayor en aptitud doble propósito (20,81%) en comparación con la lechera (14,37%).

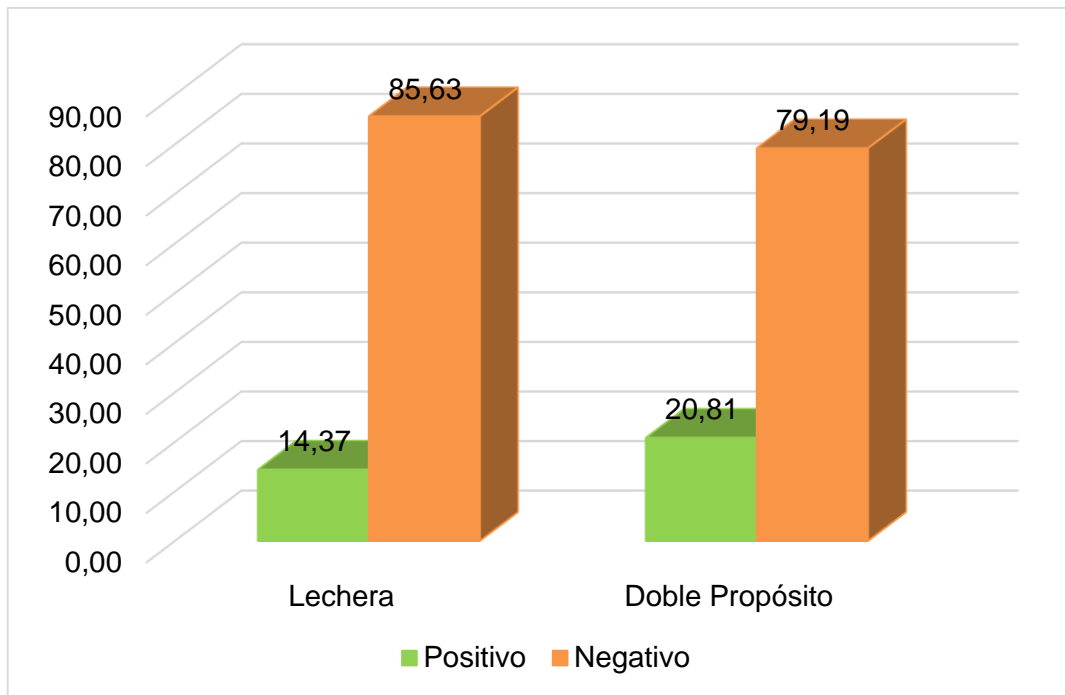


Figura 7. Seroprevalencia de *Leptospira hardjo* por aptitud.
Elaboración: Maza, 2015.

Este resultado coincide con el estudio realizado por Grooms (2006) en el cual describe al ganado como huésped de mantenimiento primario del serovar Hardjo aunque también otros agentes pueden causar leptospirosis, no obstante *Leptospira hardjo* es el más común en las poblaciones de ganado en todo el mundo con un infección global aproximadamente de 35% a 50% en muestras tomadas de lecherías y ganado de carne (Subharat et al., 2012).

3.4 Seroprevalencia de *Leptospira hardjo* por edad.

Según el resultado obtenido de infección por edad, el 19,21% de animales mayores a 48 meses son seropositivos a *Leptospira hardjo*, mientras el 14,21% corresponde a animales menores a 48 meses. Estos resultados sugieren una independencia de la variable edad para la infección de leptospira lo cual coincide con el trabajo realizado por Salgado et al., (2014) el cual determinó que el contacto directo entre ganado de diferente edad no es un factor de riesgo para la infección de leptospirosis; al contrario genera una protección contra esta enfermedad en el ternero destetado.

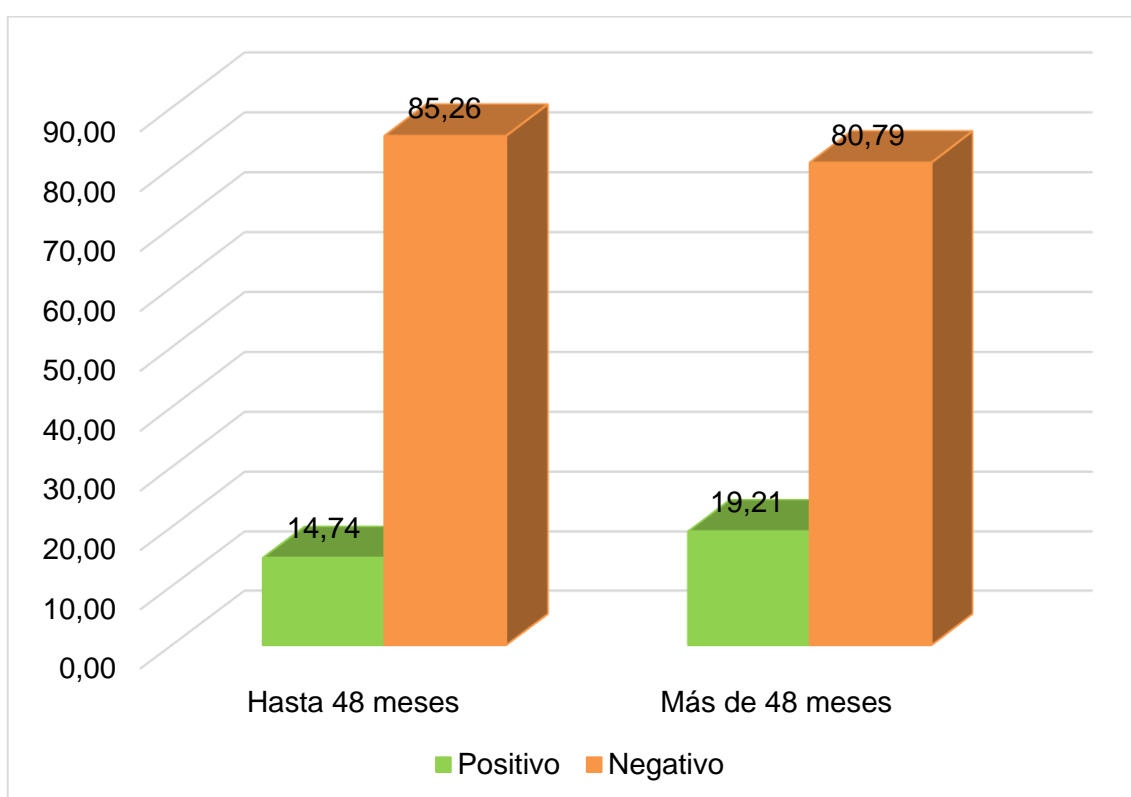


Figura 8. Seroprevalencia de *Leptospira hardjo* por edad.

Elaboración: Maza, 2015.

3.5 Seroprevalencia de *Leptospira hardjo* por sexo.

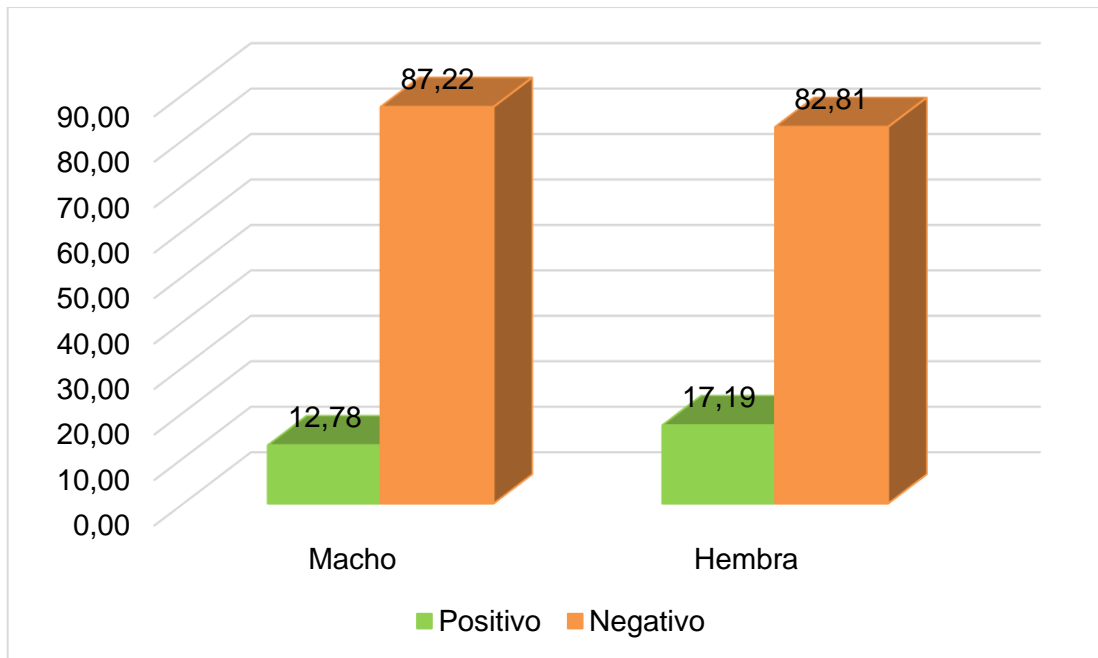


Figura 9. Seroprevalencia de *Leptospira hardjo* por sexo

Fuente: Maza, 2015.

La seropositividad en machos fue de 12,78%, y en hembras cuya prevalencia de leptospirosis fue de 17,9% superior al resultado obtenido (15%) en vacas en la región sur de Chile (Salgado et al., 2014), pero notablemente bajo en comparación al porcentaje de seroprevalencia en Colombia 34,3% y Brasil 38,3% (Betancur et al., 2013; Martins y Lilenbaum., 2013). Esta seropositividad puede corresponder a la convivencia entre hembras enfermas y sanas, aunque se ha demostrado que no hay dependencia entre la seropositividad y la variable sexo (Betancur et al., 2013).

3.6 Seroprevalencia de *Leptospira hardjo* por cantones.

Tabla 9. Seroprevalencia por cantones

Cantones	Leptospira		Total
	Positivo (%)	Negativo (%)	
Ambato	0,23	3,95	3,34
Bolívar	1,59	0,54	0,71
Cayambe	1,36	3,41	3,07
Centinela del Cóndor	3,63	2,92	3,04
Chambo	0,00	2,11	1,76
Chone	7,94	5,39	5,81
Chunchi	0,91	2,83	2,51
Cuenca	4,08	14,19	12,52
El Carmen	2,72	1,17	1,42
Girón	0,00	1,48	1,24
Guamote	0,00	1,12	0,94
Jama	14,74	5,43	6,97
Junín	0,68	0,22	0,30
La Maná	3,85	1,89	2,21
Latacunga	1,36	7,27	6,30
Mejía	0,23	1,89	1,61
Pallatanga	2,27	0,76	1,01
Pedernales	14,51	14,73	14,69
Pedro Vicente			
Maldonado	3,40	0,04	0,60
Pelileo	1,81	0,45	0,67
Penipe	0,45	1,53	1,35
Píllaro	3,40	0,81	1,24
Quero	0,23	1,39	1,20
Quito	13,15	7,27	8,25
Riobamba	0,00	0,99	0,82
Salcedo	0,00	0,67	0,56
San Miguel de los			
Bancos	2,49	0,40	0,75
Santo Domingo	12,24	9,30	9,78
Sig Sig	0,00	1,57	1,31
Sigchos	1,36	1,17	1,20

Sucre	1,13	0,49	0,60
Yantzatza	0,23	2,38	2,02
Zumbi	0,00	0,22	0,19

Elaboración: Maza, 2015.

En la tabla 9 se muestra los resultados obtenidos de prevalencia por cantones; estos valores indican que el cantón que tiene mayor prevalencia en Ecuador es Jama (Manabí) con 14,74% (CI₉₅) valores cercanos tenemos en los cantones: Pedernales (Manabí) (14,51%) (CI₉₅), seguido del cantón Quito (Pichincha) (13,15%) (CI₉₅) y Santo Domingo (12,24%) (CI₉₅), continúan cantones con prevalencia menor a 5: Bolívar, Cayambe, Centinela del Cóndor, Cuenca, El Carmen, La Maná, Pallatanga, Pedro Vicente Maldonado, Pelileo, Píllaro, San Miguel de los Bancos, Sigchos y Sucre. Menores a uno están cantones como: Ambato, Chunchi, Junín, Mejía, Penipe, Quero, Yantzatza y Zumbi. Los cantones que no cuentan con la presencia de la enfermedad son: Chambo, Girón, Guamote, Riobamba, Salcedo y Sig Sig como se muestra en la figura 9.

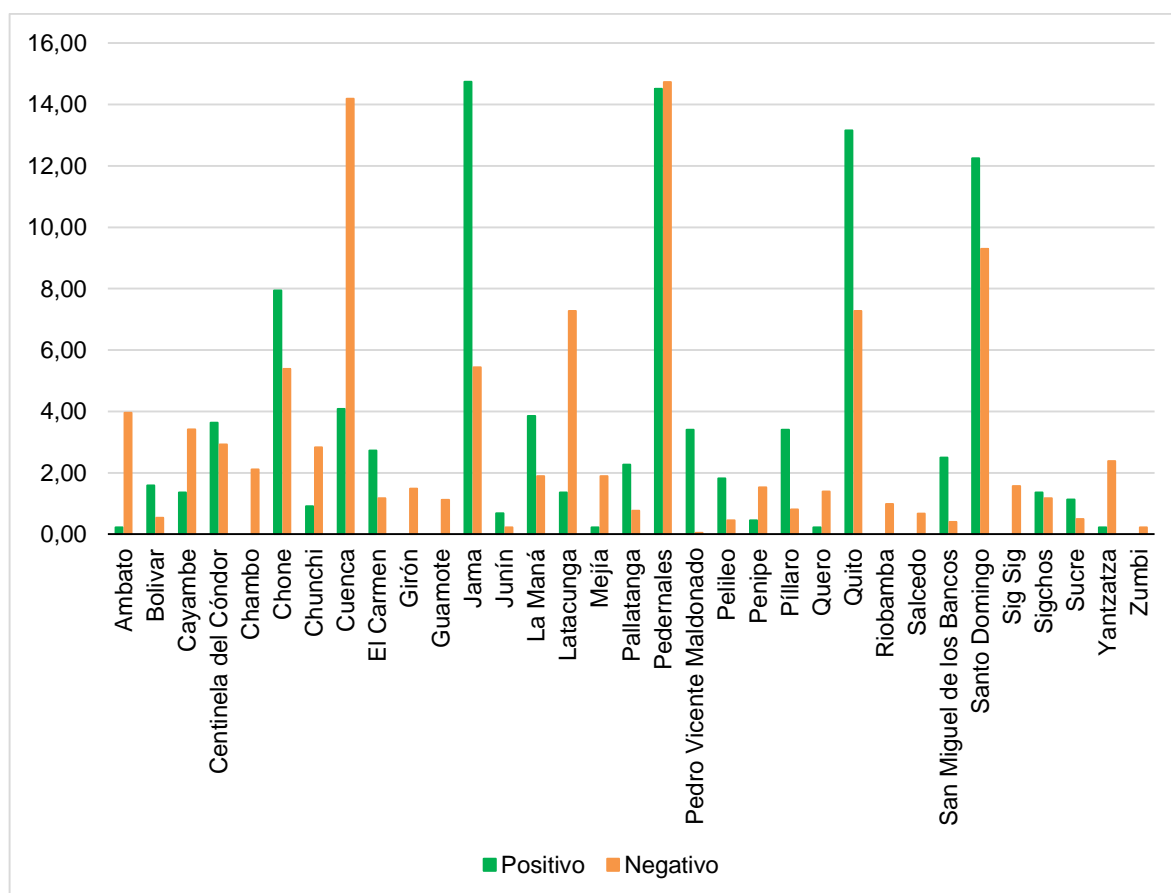
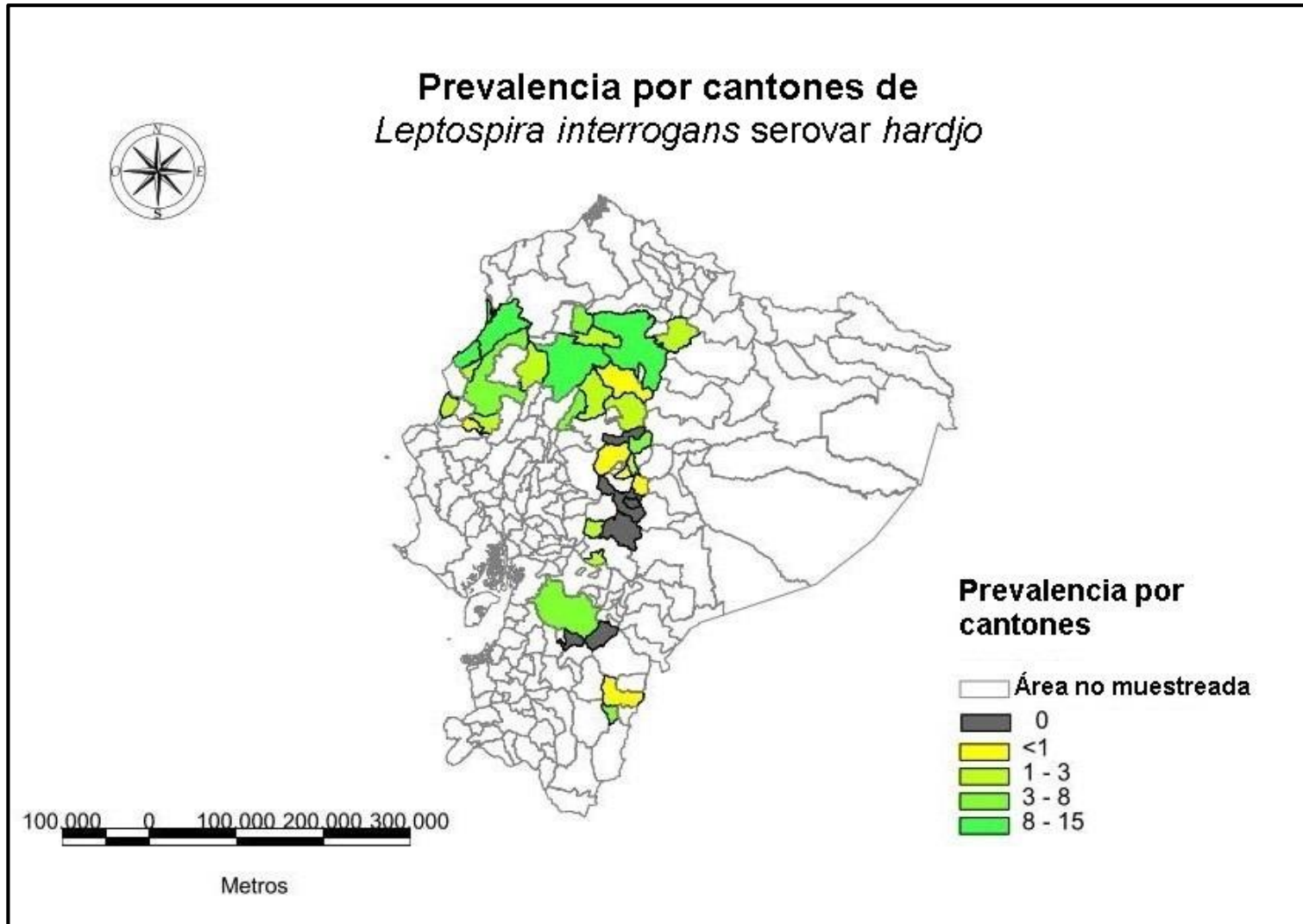


Figura 10. Seroprevalencia de *Leptospira hardjo* por sexo.

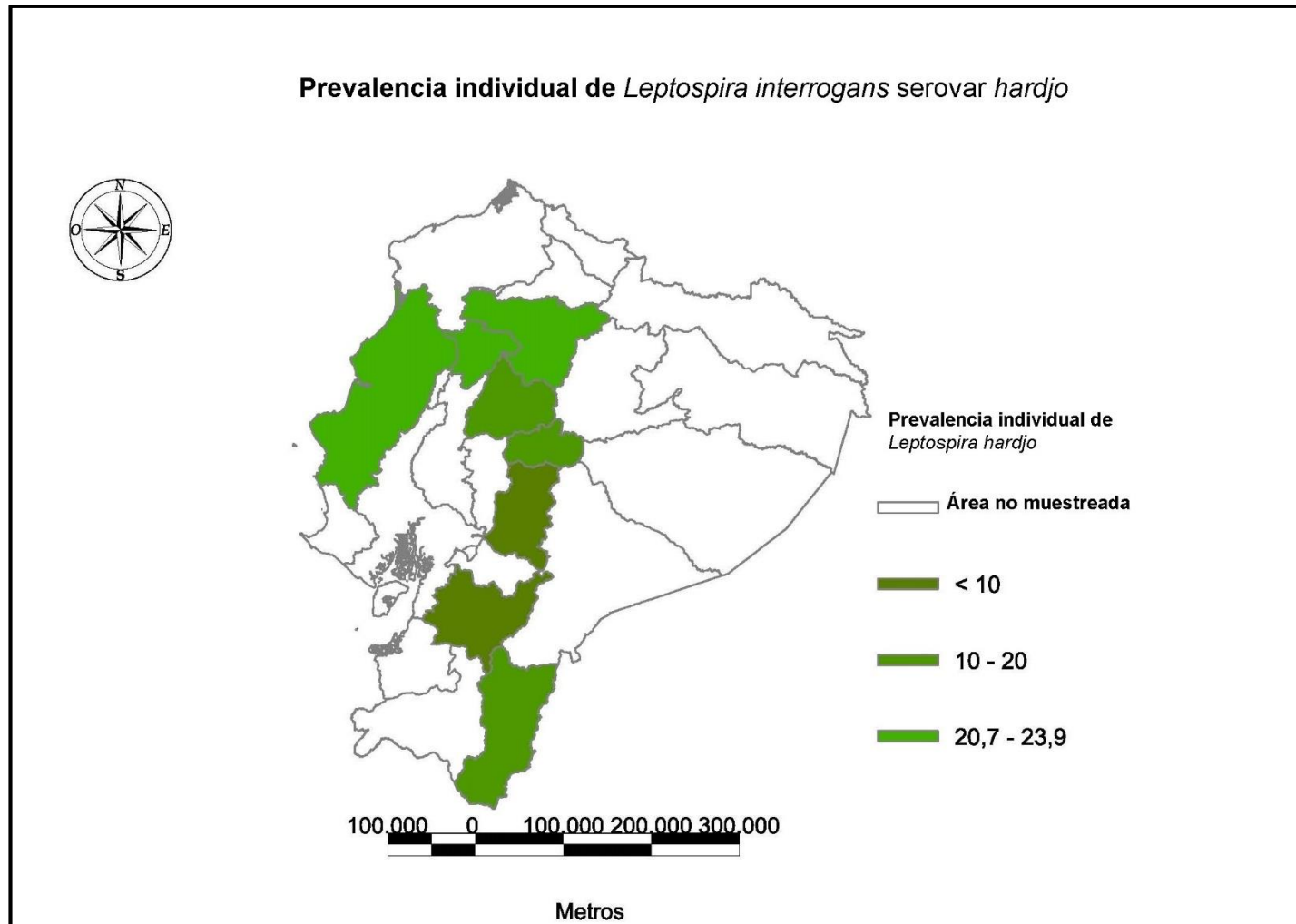
Elaboración: Maza, 2015.



Mapa 1. Seroprevalencia de *Leptospira hardjo* por cantones.

Elaboración: El autor

3.7 Seroprevalencia de *Leptospira hardjo* por provincias



Mapa 2. Seroprevalencia de *Leptospira hardjo* por provincias en Ecuador.

Elaboración: El autor

3.8 Dispersión de *Leptospira hardjo* en explotaciones de Ecuador.

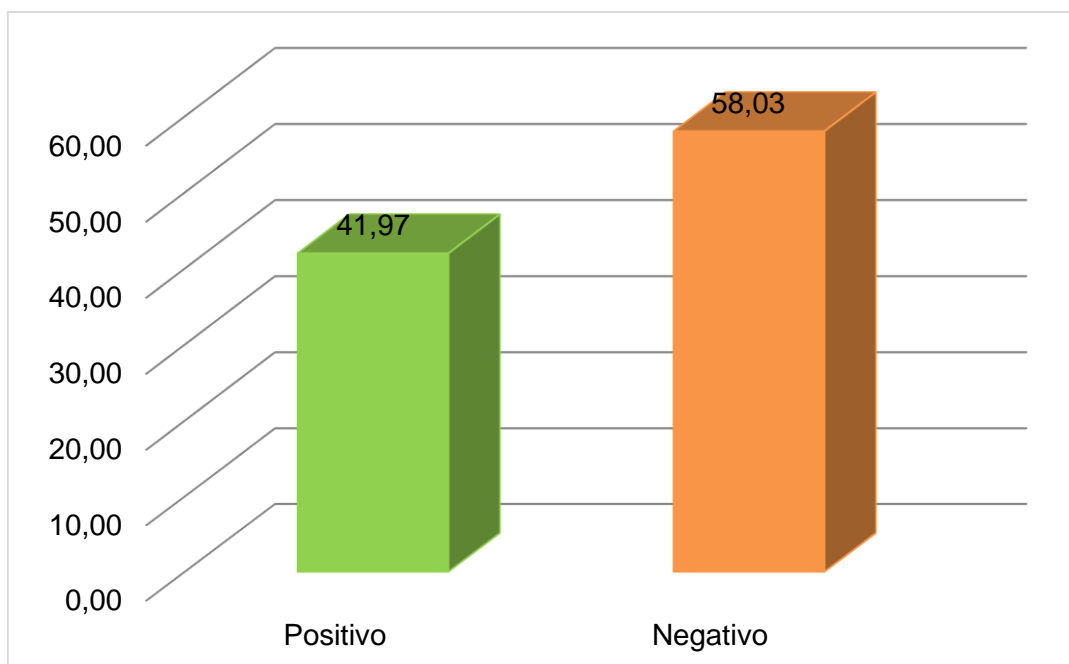
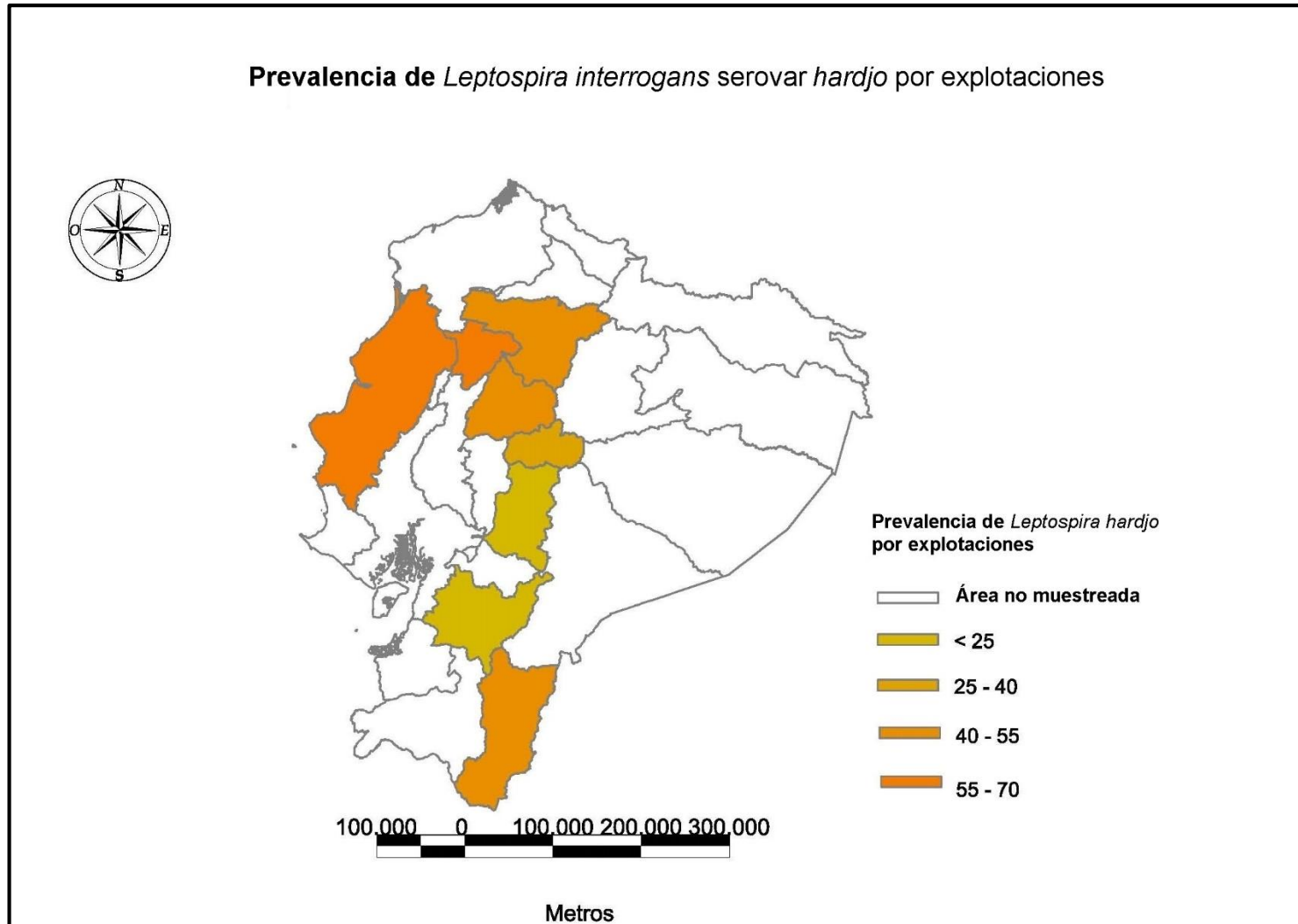


Figura 11. Dispersión de *Leptospira hardjo* en explotaciones de Ecuador.
Fuente: Maza, 2015.

En la figura 11 se muestran la dispersión o prevalencia por explotaciones de *Leptospira hardjo* en Ecuador. 41,97% (CI₉₅) corresponde a 162 explotaciones positivas al análisis de 386 granjas muestreadas, es importante indicar que se consideró positiva a la unidad productiva que presentara al menos un animal positivo comparado con el reporte por Betancur et al., 2013 quien obtuvo 58,2% y 41,7% de aptitud cárnica y doble propósito respectivamente en fincas de Colombia. Esto puede ser por el contacto cercano entre un animal hospedador infectado y un animal sano en sistemas de crianza natural influyendo en el estado de infección del rebaño.



Mapa 3. Dispersión de *Leptospira hardjo* en explotaciones de Ecuador.

Elaboración: El autor

Interpretando los mapas 2 y 3 mayor prevalencia individual se presenta en las provincias de Santo Domingo (20,7%) (CI_{%95}), Pichincha (23,9%) (CI_{%95}) y Manabí (23,5%) (CI_{%95}) mientras tanto la prevalencia por explotaciones las provincias de Santo Domingo (62,9%) y Manabí (65,1%) (CI_{%95}) presentan una mayor prevalencia de *Leptospira hardjo* esto que podría ser por las condiciones climáticas, y principalmente debido al ganado infectado que actúa como reservorio de esta enfermedad, además considerando el subdiagnóstico y la falta de programas de sanidad animal para esta enfermedad (Vijayachari et al., 2008; Verma et al., 2013; Betancur et al., 2013).

CONCLUSIONES

- La seroprevalencia (16,5%) (CI₉₅) y prevalencia real de 13,7% (CI₉₅) determinada en este estudio, ubica al Ecuador entre los países de Latinoamérica de menor prevalencia.
- La dispersión de *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* en explotaciones del Ecuador es de 41,97% (CI₉₅).
- El resultado obtenido para la variable aptitud, edad, sexo confirman al ganado bovino como huésped de mantenimiento primario pudiendo contagiar a nuevos animales que ingresan a la explotación, contribuyendo de esta manera a la epidemiología de la leptospirosis a nivel mundial.
- Valores altos de prevalencia de *Leptospira hardjo* se encuentran en provincias de clima tropical coincidiendo con la literatura en la cual se describe a la leptospirosis como una enfermedad tropical.
- Las Leptospiras patógenas pueden infectar cualquier especie animal. Pero solo un pequeño número de serotipos será endémica en cualquier región o país en particular. Además la *Leptospira* muestra una “*nidality natural*” (focalidad), y cada serovar persiste en huéspedes específicos de mantenimiento, consecuentemente, en cualquier región, una especie de animales domésticos será infectado por serovares o especies mantenidas en animales del área (OIE, 2014).
- La leptospirosis es una de las enfermedades zoonóticas más extendidas y frecuentes en el mundo, la epidemiología es reemergente afectando a miles de personas causando en ciertos casos la muerte. Esta infección ocurre por contacto con suelo y agua contaminada; los pequeños mamíferos son uno de los huéspedes de mantenimiento, de esta manera se propaga la enfermedad a los animales domésticos y personas.
- La prueba de ELISA permite determinar la prevalencia de cierta enfermedad presente en una población de manera rápida además de determinar si la infección se encuentra en fase aguda o crónica contribuyendo al diagnóstico clínico diferencial.

- El conocimiento de los serotipos prevalentes y sus huéspedes de mantenimiento es esencial para la comprensión de la epidemiología de la enfermedad en cualquier región.

RECOMENDACIONES

Según los resultados obtenidos, se recomienda lo siguiente:

- Notificar al Ministerio de Salud Pública y Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca sobre la situación epidemiológica de la enfermedad, con el fin de dar a conocer sobre esta enfermedad puesto que está relacionada con la infección a profesionales del sector agropecuario, además, existe un factor de riesgo de infección para personas del sector urbano que practican deportes acuáticos y actividades de contacto con el medio ambiente como el camping.
- Continuar con estudios que evalúen los factores de riesgo para *Leptospira hardjo* con la finalidad de reunir más información en profundidad sobre el ganado productor de leche y doble propósito del país, de tal manera permita conocer detalles que posiblemente favorecen la transmisión de la leptospirosis tanto individual como intrarrebaño.
- Establecer un programa sanitario preventivo como medida de prevención en regiones que tengan historial de brotes de leptospirosis, además de aplicar planes de control de plagas como los roedores en estas zonas y sus alrededores.
- La leptospirosis puede ser controlada de manera efectiva mediante la vacunación anual.

BIBLIOGRAFÍA

Alder, B., De la Peña, A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology* 140, 287-296.

Alfaro, C., Aranguren, Y., Clavijo, A., Díaz, C. (2004). Prevalencia serológica de leptospirosis en ganado doble propósito del noreste de Monagas, Venezuela. *Zootecnia Tropical*. 22, 2, 117-124.

André-Fontaine, G., 2006. Canine leptospirosis-do we have a problem? *Veterinary Microbiology* 117, 19-24.

Area'n, V. (1962). The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). *American Journal Pathology*. 40, 393–423.

Banfi, E., M. Cinco, M. Bellini, and M. R. Soranzo. 1982. The role of antibodies and serum complement in the interaction between macrophages and leptospires. *Journal General Microbiol.* 128, 813–816.

Barragan, V., Mejia, M., Trávez, A., Zapata, S., Hartskeerl, R., Haake, D., Trueba, G. (2011). Interactions of *Leptospira* with Environmental Bacteria from Surface Water. *Current Microbiology*; 62, 1802-1806.

Betancur, C., Orrego, A., Gonzáles, M. (2013). Seroepidemiología de la leptospirosis en bovinos con trastornos reproductivos en el municipio de Montería, Colombia. *Revista Médica Veterinaria*. 26, 47-55.

Bharti, A., Nally, J., Ricaldi, J., Matthias, M., Diaz, M., Lovett, M., Levett, P., Gilman, R., Willig, M., Gotuzzo, E. and Vinetz, J. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global Importance . *The Lancet Infectious Diseases*. 3, 757-71.

Bolin, C. (2000). Leptospirosis, (pp. 185–200). In C. Brown and C. Bolin (Eds.), *Emerging diseases of animals*. ASM Press, Washington, D.C

Carbonero, A., Saa, L., Jara, D., García-Bocanegra, I., Arenas, A., Borge, C. & Perea, A. (2011). Seroprevalence and risk factors associated to Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) infection in non-vaccinated dairy and dual purpose cattle herds in Ecuador. *Preventive Veterinary Medicine* 100, 84-88.

Cullen, P.A., Haake, D.A., Adler, B. (2004). Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiology Reviews* 28, 291–318.

Cullen, P.A., Xu, X., Matsunaga, J., Sanchez, Y., Ko, A.I., Haake, D.A., Adler, B. (2005). Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infection and Immunity* 73, 4853–4863.

Deanna, S., Lo, M., Bulach, D., Quinsey, N., Murray, G., Allen, A., Adler, B. (2013). Recombinant LipL32 stimulates interferon-gamma production in cattle vaccinated with a monovalent *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo subtype Hardjobovis vaccine. *Veterinary Microbiology*, 169, 163-170.

Department of Agriculture and Fisheries, Queensland Government. (2010). "Health management and diseases: Leptospirosis in dairy cattle". *Queensland Government; Department of Agriculture and Fisheries*. [En línea]. Australia, disponible en: <https://www.daf.qld.gov.au/animal-industries/dairy/health-management-and-diseases/leptospirosis> [Accedido el día 6 de abril de 2015].

Ding, M., Yelton, D. (1993). Cloning and analysis of the *leuB* gene of *Leptospira interrogans* serovar pomona. *Journal Genetic Microbiology*. 139, 1093-1103.

Djelouadji, Z., Roux, V., Raoult, D., Kodjo, A., Drancourt, M. (2012). Rapid MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Leptospira* organisms. *Veterinary Microbiology*, 158, 142-146.

Dolhnikoff, M., Mauad, E. P. Bethlem and C. R. Carvalho. (2007): Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis. *Brazilian Journal Infectious Diseases*, 11, 142-148.

Ellis, W., O'Brien, J., Cassells, J. (1985). Excretion of *Leptospira interrogans* serovar hardjo following calving or abortion. *Research in Veterinary Science*.39, 296–298.

Faine, S., Adler, B., C. Bolin, and P. Perolat. (1999). *Leptospira and leptospirosis*, 2nd ed. *Medicine Science*, Melbourne, Australia.

Faisal, S., McDonough, S., Chang, Y. (2012). Capítulo VIII. *Leptospira*: invasion, pathogenesis and persistence. *The Pathogenic Spirochetes: strategies for evasion of host immunity and persistence*. *Springer Science and Business Media*: New York.

Gamboa, A., Vasco, L., Espinel, M., Coloma, J., Trueba, G. (2013). Difficulties in the differential diagnosis of dengue and leptospirosis in Guayaquil. *Avances en Ciencias e Ingeniería*.

Grooms, D. (2006). Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. *Theriogenology*. 66, 624-628.

Hartskeerl, R. (2011). Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clinical Microbiology Infection*. 17, 494-501.

Hovind-Hougen, K, W., Ellis and A. Birch-Andersen. (1981). *Leptospira parva* sp. npv: some morphological and biological characters. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hygiene*. 250, 343-354

Kmety, E., Dikken, H. (1993). Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovars. University Press Groningen, Groningen The Netherland.

Leonard, N. (2008). *Leptospirosis in Cattle – Infection and Control*. FAO.

Levett, P. (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Review*. 14, 196–326.

Levett, P., and Haake, D. (2010). *Leptospira* species (leptospirosis). Principles and practice of infectious diseases, *Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia*, 3059-3065.

Levett, P., Morey, R., Galloway, R., Turner, D., Steigerwalt, A., Mayer, L. (2005). Detection of pathogenic leptospire by real-time quantitative PCR. *Journal of Medical Microbiology*; 54, 45–49.

Manock, S., Jacobsen, K., Brito, N., Russel, K., Negrete, M., Olson, J., Sánchez, J., Blair, P., Smalligan, R., Quis, B., Freire, J., Espinoza, W., MacComick, F., Fleming, L. & Kochel, T.

(2009). Etiology of Acute Undifferentiated Febrile Illness in the Amazon Basin of Ecuador. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. (81) 1,146-151.

Martins, G. and Lilenbaum, W. (2013). The panorama of animal leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil, regarding the seroepidemiology of the infection in tropical regions. *BMC Veterinary Research*; 9, 237-244.

Martins, G., Penna, B., Lilenbaum, W. (2012). Differences between seroreactivity to leptospirosis in dairy and beef cattle from the same herd in Rio de Janeiro, Brazil. *Tropical Animal Health Prod* 44, 377-378.

McBride, A., Athanazio D., Reis M. (2005). Leptospirosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 18, 376–386.

McGrath, H., B. Adler, T. Vinh and S. Faine, 1984: Phagocytosis of virulent and virulent
Méndez, C., Benavides, L., Esquié, A., Aldama, A., Torres, J., Gavaldón, D., Meléndez, P., Moles, L. (2013). Pesquisa serológica de *Leptospira* en roedores silvestres, bovinos, equinos y caninos en el noroeste de México. *Revista Salud Animal*. Vol. 35; 1, 25-32.

Merc & CO., INC. (2007). Manual Merck de Veterinaria. Volumen I, 513-517.

Merien, F., Baranton, G., Perolat, P. 1997. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. *Infection and Immunity* 65, 729–738.

Ochoa, J., Sánchez, A., Ruiz, I. (2000). Epidemiología de la leptospirosis en una zona andina de producción pecuaria. *Revista Panamericana Salud Pública*, 7, 325-331.

OIE (2014). *Manual sobre animales terrestre OIE*. Capítulo 2.1.9.

OIE. (2008). *Manual sobre animales terrestres OIE*. Capítulo 2.1.9.

Pappas, G., Papadimitriou, P., Siozopoulou, V., Christou, L., Akritidis, N. (2008). The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *International Journal of Infectious Diseases*. 12, 351-357.

Petrakovsky, J., Bianchi, A., Fisum, H., Nájera, P., Pereira, Martha. (2014). Animal Leptospirosis in Latin America and the Caribbean Countries: Reported Outbreaks and Literature Review (2002–2014). *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 11, 10770-10789.

Picardeau, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Medecine et Maladies Infectieuses*; 43 (1), 1–9.

Pierce, P., Utz, J. and Lack, E. (1997). Leptospirosis, (pp. 615–619). *Pathology of infectious diseases*. In D. H. Connor, F. W. Chandler, D. A. Schwartz, H. J. Manz, & E. E. Lack (Eds.), Volumen I, Appleton & Lange, Stamford, Conn.

Que-Gewirth, N.L.S., Ribeiro, A.A., Kalb, S.R., Cotter, R.J., Bulach, D.M., Adler, B., Girons, I.S., Werts, C., Raetz, C.R.H. (2004). A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in *Leptospira interrogans* Lipid A: The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. *Journal of Biological Chemistry* 279, 25420–25429.

Rivera, H., Benito, A., Ramos, O., Manchego, A. (2004). Prevalencia de enfermedades de impacto reproductivo en bovinos de la estación experimental de trópico del centro de investigaciones IVITA. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 15 (2), 120-126.

Rodrigues, T., Carvalho, E., Isaac, L., Silva, A. (2015). *Leptospira* and Leptospirosis. *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*. Volume 3, Pages 1973-1990.

Ryan, E., Leonard, N., O'Grady, L., Doherty M., More, S. (2012). Herd-level risk factors associated with *Leptospira Hardjo* seroprevalence in Beef/Suckler herds in the Republic of Ireland. *Irish Veterinary Journal*, 65, 6–15.

Saa, L. (2009). TESIS DOCTORAL. *Estudio epidemiológico de los principales agentes víricos del síndrome respiratorio bovino en explotaciones lecheras de Ecuador*. Córdoba, España.

Salgado, M., Otto, B., Sandoval, E., Reinhardt, G., Boqvist, S. (2014). A cross sectional observational study to estimate herd level risk factors for *Leptospira* spp. serovar in small holder dairy cattle farms in southern Chile. *BMC Veterinary Research*. 10,126.

Sanders, E., Rigau-Perez, J., Smits, H., et al (1999). Increase of leptospirosis in dengue-negative patients after a hurricane in Puerto Rico in 1996. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 61, 935–941.

Seguro, A., Andrade, L., (2013). Pathophysiology of leptospirosis. *Shock*; 39 (Suppl. 1), 17-23.

Shang, E.S., Exner, M.M., Summers, T.A., Martinich, C., Champion, C.I., Hancock, R.E., Haake, D.A. (1995). The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. *Infection and Immunity* 63, 3174–3181.

Subharat, S. (2010). TESIS DOCTORAL. *Epidemiology, diagnosis and vaccination control of leptospirosis in farmed deer in New Zealand*. Palmerston North, New Zealand.

Subharat, S., Wilson, P., Heuer, C., Collins-Emerson, J. (2012). Longitudinal serological survey and herd-level risk factors for *Leptospira* spp. Serovars Hardjo-bovis and Pomona on deer farms with sheep and/or beef cattle. *New Zealand Veterinary Journal*, 60, 215–222.

Thaipadunpanit, J., Chierakul, W., Wuthiekanun, V., Limmathurotsakul, D., Amornchai, P., Boonslip, S., Smythe, L., Limpaboon, R., Hoffmaster, A., DAY N.P. J. and PEACOCK S.J. (2011). Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and lipI32 genes for human Leptospirosis in Thailand: a case-control study. *Plos One*; 6: (Edi.)16236.

Thrusfield, M. (2007). *Veterinary epidemiology, third edition*. Black-well Publishing: New York, USA.

Tizard, I (2009). Introducción a la Inmunología Veterinaria. *Elsevier España*. Barcelona, España. 8 (Edi.), 511-512.

Toma, R & Kazar, J. (1991). Evidence for the structural heterogeneity of the polysaccharide component of pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*; 11, 142-148.

Verma, A., Stevenson, B., Adler, B. (2013). Leptospirosis in horses. *Veterinary Microbiology*, 161, 61-66.

Vijayachari, P, Sugunan, A., Shriram, A. (2008). Leptospirosis: An emerging global, public Health problem. *Journal of Biosciences*, 33, 557–569.

Universidad de Zaragoza (2006). Win Epi; Working in Epidemiology. *Ignacio de Blass. Facultad de Veterinaria*. [En línea]. España, disponible en: <http://www.winepi.net/> [Accedido el día 5 de mayo de 2015].

Vinh, T., B. Adler and S. Faine, (1982): The role of macrophages in the protection of mice against leptospirosis: *in vitro* and *in vivo* studies. *Pathology*, 14, 463-468.

World Health Organization (2001). Fatal leptospirosis, Azores Islands. *The Weekly Epidemiological Record*. 76, 109–111.

World Health Organization (2003). Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. Geneva, Switzerland: WHO.

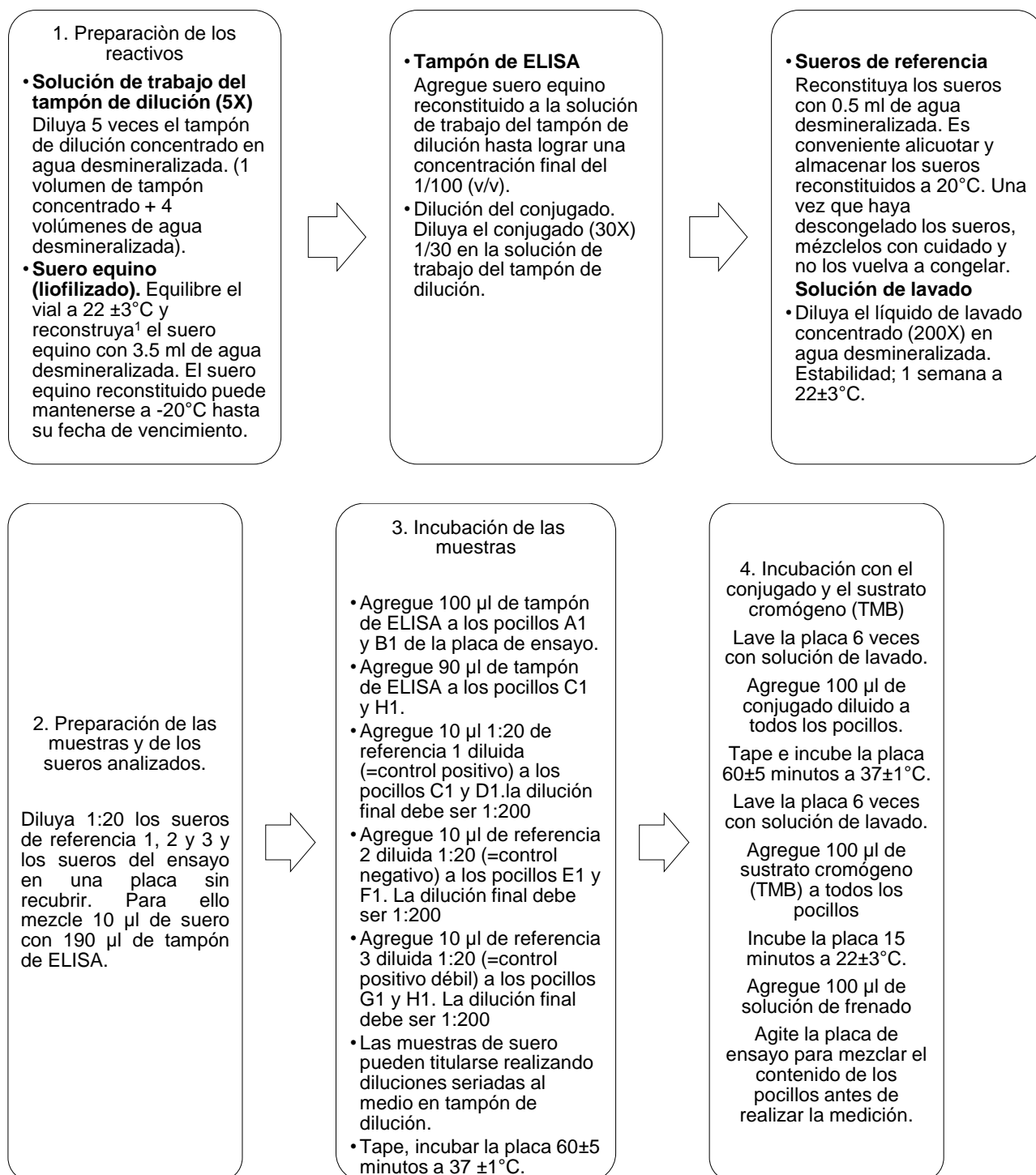
Zaki, S. and Spiegel, R. (1998). Leptospirosis (pp. 73–92). In A. M. Nelson & C. R. Horsburgh (Eds.), *Pathology of emerging infections 2. American Society for Microbiology*, Washington, D.C.

Zapata, S., Trueba, G., Bulach, M., Boucher, D., Alder, B. & Hartskeerl. (2010). Characterization of a lipopolysaccharide mutant of *Leptospira* derived by growth in the presence of an anti-lipopolysaccharide monoclonal antibody. *Federation of European Microbiological Societies*, 309, 144-150.

ANEXOS

ANEXO 1

El análisis serológico de laboratorio sigue el protocolo descrito en la tabla contigua:



5. Lectura del ensayo y cálculo de los resultados

Leer los resultados con un lector de ELISA a una longitud de onda de 450 nm.



3. Cálculo de porcentaje de positividad (PP) de las referencias 2 y 3 y de las muestras del ensayo según la siguiente fórmula.

El PP se expresa como la DO_{450} corregida de todas las muestras sobre la media de la DO_{450} corregida del suero de la referencia 1 (pocillos C1 y D1).

$$PP = \left[\frac{DO_{450} \text{ CORREGIDA DE LAS MUESTRAS}}{DO_{450} \text{ CORREGIDA DEL SUERO DE REFERENCIA 1}} \right] \times 100$$

6. Interpretación de los resultados.

Criterios de Validación

La media de los blancos (pocillos A1 Y B1) debe ser $<0,150$.

La DO_{450} corregida de la referencia 1 (pocillos C1 y D1) debe ser $\geq 1,000$.

La media del PP del suero de la referencia 2 debe ser <20 .

La media del PP del suero de la referencia 3 debe estar comprendida entre 20 y 60.

Los resultados de un ensayo específico son válidos solamente si se cumplen los criterios antes mencionados.

INTERPRETACIÓN DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN

PP %	$<20\%$	20% a 45%	$>45\%$
Interpretación	Negativo	Dudoso	Positivo

Sensibilidad del Kit PrioCHECK L.hardjo Ab: 100%

Especificidad del Kit PrioCHECK *L.hardjo* Ab: 96,8%

ANEXO 2

MATERIALES

Kit ELISA para la detección *in vitro* de anticuerpos dirigidos contra *Leptospira interrogans* serovar hardjo en suero y leche bovina (PrioCHECK® *L. hardjo* Ab).

Pipetas de precisión mono y multicanal. 10 a 1000 μ l
Puntas de pipeta desechables. 5-1000 μ l
Cilindro graduado de 10 a 1000ml

EQUIPOS

Lector de microplacas

Dispositivos para aplicación y aspiración de solución de lavado. Lavador automático ELISA

Cámara húmeda o incubadora (PST-60 HL).

Agitador vortex

Fuente: El autor.

ANEXO 3

Tabla 1a. Prevalencia de leptospira en Ecuador.

Leptospira			
		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	Positivo	441	16,5
	Negativo	2227	83,5
	Total	2668	100

Fuente: El autor

Tabla 2a. Prevalencia de leptospira por sexo.

		Sexo					
		Macho	%	Hembra	%	Total	%
Leptospira	Positivo	51	12,78	390	17,19	441	16,53
	Negativo	348	87,22	1879	82,81	2227	83,47
Total		399	100,00	2269	100	2668	100

Fuente: El autor

Tabla 3a. Prevalencia de leptospira por edad.

		Edad					
		Hasta 48	%	Más de 48	%	Total	
Leptospira	Positivo	236	14,74	205	19,21	441	
	Negativo	1365	85,26	862	80,79	2227	
Total		1601	100	1067	100	2668	

Fuente: El autor

Tabla 4a. Prevalencia de leptospira por aptitud.

		Aptitud					
		Lechera	%	Doble Propósito	%	Total	
Leptospira	Positivo	255	14,37	186	20,81	441	
	Negativo	1519	85,63	708	79,19	2227	
Total		1774	100,00	894	100,00	2668	

Fuente: El autor

Tabla 5a. Dispersión Prevalencia de leptospira en explotaciones de Ecuador.

Leptospira			
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
		Porcentaje válido	

Válidos	Positivo	162	41,97	41,97	41,97
	Negativo	224	58,03	58,03	100
	Total	386	100	100	

Fuente: El autor

Tabla 6a. Prevalencia por provincias.

		Leptospira					
		Positivo		Negativo		Total	
		f	%	f	%	f	%
	Azuay	18	4,5	384	95,5	402	15,1
	Chimborazo	16	7,2	206	92,8	222	8,3
	Cotopaxi	29	11,2	230	10,3	259	9,7
Prevalencia	Manabí	191	23,5	623	28,0	814	30,5
por	Pichincha	91	23,9	290	13,0	381	14,3
provincias	Santo Domingo	54	20,7	207	9,3	261	9,8
	Tungurahua	25	13,2	164	7,4	189	7,1
	Zamora	17	12,1	123	5,5	140	5,2
	Chinchipe						
	Total	441	16,5	2.227	83,5	2.668	100

Fuente: El autor