



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
PEDRO RUIZ GALLO**



**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**“PREVALENCIA DE *Leptospira spp.* MEDIANTE LA DETECCIÓN  
MOLECULAR EN MUESTRAS DE ORINA DE TRABAJADORES  
DEL CAMAL MUNICIPAL JOSÉ LEONARDO ORTIZ,  
OCTUBRE - DICIEMBRE 2017”**

**TESIS  
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
MÉDICO VETERINARIO**

**PRESENTADA POR:**

**DENIS ROLANDO SERQUÉN ALARCÓN**

**BILA MARINA TERRONES HERNÁNDEZ**

**LAMBAYEQUE – PERÚ**

**2017**

**Aprobado ante el siguiente jurado:**

---

**M.V.Z. Jorge Eduardo Ravines Zapatel**

**Presidente**

---

**M. Sc. Lumber Ely Gonzáles Zamora**

**Secretario**

---

**M.V. Dionicio Baique Camacho**

**Vocal**

---

**M.V. Zully Montenegro Esquivel**

**Asesora**

## **DEDICATORIA**

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado la vida y salud para lograr mis objetivos

A mis padres y abuelos, quienes me han apoyado todos estos años, por su infinito amor, cariño y comprensión.

A todos mis amigos; por ayudarme a crecer, madurar como persona y estar siempre conmigo apoyándome en todas las circunstancias posibles.

**Denis Rolando Serquén Alarcón**

## **DEDICATORIA**

A Dios, por ser la luz que guía mi camino y darme las fuerzas necesarias para continuar luchando día tras día.

A mi madre Nícida, por ser el pilar más importante y mi motivo para seguir adelante.

A mis queridos hermanos: Jesús, Sandra, Clauder y Carlos a los que quiero mucho.

A mis queridos maestros Dra. Magaly Diaz García, Dr. Diocinio Baique Camacho y Dr. Lumber Gonzáles Zamora.

**Marina Terrones Hernández**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por darme la fuerza y el coraje para hacer este sueño realidad, por ser mi guía y acompañarme siempre en todo momento de dificultad.

A mis padres, Rolando Serquén Puyén y Orializ Alarcón Guevara, que sin duda alguna en el trayecto de mi vida me han demostrado su amor corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos.

A mis queridos abuelos Rosalía Guevara R., María Puyén I. y Catalino Serquén T. Sus canas son sinónimo de sabiduría. Me enseñaron muchas cosas vitales para la vida, y me encaminaron por el buen sendero.

A mi maestro, el M.V. Dionicio Baique Camacho, quien con su amplia experiencia en la investigación me brindó su apoyo incondicional.

Al equipo de Investigación del Hospital Regional Lambayeque, por el apoyo y enseñanza que me brindaron. En especial a mi gran amigo Blgo. Luis Miguel Serquén López por su constante y paciente seguimiento y asistencia compartiendo su tiempo de manera generosa durante el desarrollo del presente trabajo.

**Denis Rolando Serquén Alarcón**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a DIOS por protegerme durante todo mi camino y darme fuerzas para superar obstáculos y dificultades a lo largo de toda mi vida.

A mis padres; en especial a mi madre, Nícida Hernández Lozano quien con su apoyo incondicional me ha enseñado a no desfallecer ni rendirme ante nada y siempre perseverar.

A mis hermanos; Jesús, Sandra, Carlos, Claudio, no imaginan cuanto los quiero, gracias porque siempre estuvieron ahí para apoyarme en las buenas y malas y darme fuerzas para seguir adelante.

A mis maestros, el Dr. Dionicio Baique Camacho y la Dra. Magaly Díaz García, quienes se han tomado el arduo trabajo de transmitirme sus conocimientos durante mi carrera universitaria, pero además de eso, han sido los que me han sabido encaminar por el camino correcto, por su apoyo incondicional para poder culminar esta investigación.

Al equipo de investigación del Hospital Regional Lambayeque. Por habernos ayudado en la elaboración de esta investigación.

**Marina Terrones Hernández**

## CONTENIDO

ÍTEM	Página
DEDICATORIA .....	i – ii
AGRADECIMIENTO .....	iii – iv
CONTENIDO .....	v – vi
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT .....	xi
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE BIBLIOGRAFÍA .....	2
2.1. Antecedentes Bibliográficos .....	3 – 5
2.2. Base teórica .....	6
2.3. Etiología .....	6 – 7
2.4. Epidemiología .....	7
2.5. Agente .....	8
2.6. Taxonomía y Clasificación.....	8 – 9
2.7. Modo de transmisión y fuentes de infección.....	9
2.8. Patogenie .....	10
2.9. Inmunidad .....	11
2.10. Diagnóstico .....	11 – 12
2.11. Tratamiento .....	12 - 13
2.12. Epidemiología de la Leptospirosis en el Perú.....	13
2.13. Epidemiología de la Leptospirosis Humana .....	14 - 15

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución .....	16
3.2. Muestra biológica .....	16
3.3. Materiales	
3.3.1. Materiales para la recolección de muestras .....	16
3.3.2. Materiales para la preparación del PCR .....	16
3.3.3. Vestuario y Bioseguridad .....	17
3.3.4. Reactivos .....	18
3.4. Metodología	
3.4.1. Toma de muestra .....	18
3.4.2. Análisis de la muestra.....	19
3.4.2.1. Extracción de DNA en orina .....	19 – 20
3.4.2.2. Preparación del Master Mix .....	21
3.4.2.3. Amplificación .....	21
3.4.2.4. Preparación del gel de agarosa al 2% .....	21 – 22
3.4.2.5. Electroforesis .....	22 – 23
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24 – 29
V. CONCLUSIONES.....	30
VI. RECOMENDACIONES .....	31
VII. BIBLIOGRAFÍA .....	32 – 35
ANEXOS .....	36 - 48



## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	Página
N°	
1. Prevalencia de Leptospirosis mediante la técnica molecular PCR en muestras de orina de trabajadores del camal municipal José Leonardo Ortíz, Octubre – Diciembre del 2017 .....	24
2. Prevalencia de Leptospirosis según sexo diagnosticado mediante la técnica molecular PCR en muestras de orina de trabajadores del camal municipal de José Leonardo Ortíz, Octubre – Diciembre del 2017.....	28
3. Prevalencia de Leptospirosis según edad diagnosticado mediante la técnica molecular PCR en muestras de orina de trabajadores del camal municipal de José Leonardo Ortíz, Octubre – Diciembre del 2017.....	29
4. Prevalencia de Leptospirosis según ocupación diagnosticado mediante la técnica molecular PCR en muestras de orina de trabajadores del camal municipal de José Leonardo Ortíz, Octubre – Diciembre del 2017.....	30

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

### GRÁFICO

Nº	Página
1. Resultado del estudio de prevalencia de Leptospirosis diagnosticado mediante la técnica molecular PCR en muestras de orina de trabajadores del camal municipal de José Leonardo Ortíz, Octubre – Diciembre del 2017.....	27
2. Resultados del estudio de prevalencia de Leptospirosis según sexo diagnosticado mediante la técnica molecular PCR en muestras de orina de trabajadores del camal municipal de José Leonardo Ortíz, Octubre – Diciembre del 2017 .....	28
3. Resultados del estudio de prevalencia de Leptospirosis según edad diagnosticado mediante la técnica molecular PCR en muestras de orina de trabajadores del camal municipal de José Leonardo Ortíz, Octubre – Diciembre del 2017.....	29
4. Resultados del estudio de prevalencia de Leptospirosis según ocupación diagnosticado mediante la técnica molecular PCR en muestras de orina de trabajadores del camal municipal de José Leonardo Ortíz, Octubre – Diciembre del 2017.....	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

### FIGURA

Nº

Página

- |  |    |
|--|----|
| 1. Leptospira.....                             | 8  |
| 2. Transmisión de Leptospira .....             | 10 |
| 3. Electroforesis en gel de agarosa al 2%..... | 23 |

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la prevalencia de *Leptospiriosis* spp. en muestra de orina de trabajadores del camal municipal de José Leonardo Ortíz durante los meses de Octubre – Diciembre 2017, así como su asociación con la edad, sexo y ocupación. Es un estudio de tipo descriptivo transversal correlacional, se analizaron 42 trabajadores: 2 femeninos, 40 masculinos entre 21 a más de 61 años. Ocupación: jalador, matarife, médico veterinario, menudencia, personal de limpieza, practicante, recaudador municipal, vendedores, transportistas. Las muestras fueron analizadas mediante la técnica molecular PCR en el laboratorio de Biología Molecular del Hospital Regional Lambayeque. La prevalencia de *Leptospiriosis* de los trabajadores del camal municipal de José Leonardo Ortíz Octubre – Diciembre 2017 fue el 0%.

**Palabras clave:** *Leptospiriosis*, Técnica molecular (PCR), Biología Molecular.

## **ABSTRACT**

The objective of the present study was to determine the prevalence of *Leptospiriosis* spp. in the urine sample of workers of the municipal camal of José Leonardo Ortíz during the months of October - December 2017, as well as its association with age, sex and occupation. This is a cross-sectional, descriptive study. 42 workers were analyzed: 2 female, 40 male, between 21 and over 61 years old. Occupation: squeegee, slaughterer, veterinarian, giblets, cleaning staff, practitioner, municipal collector, vendors, transporters. The samples were analyzed using the molecular PCR technique in the Molecular Biology laboratory of the Lambayeque Regional Hospital. The prevalence of *Leptospiriosis* spp. of the workers of the municipal camal of José Leonardo Ortíz October - December 2017 was 0%.

**Key words:** *Leptospiriosis*, Molecular technique (PCR), Molecular biology.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

La Leptospirosis es una enfermedad cosmopolita infecto-contagiosa, aguda y febril causada por una bacteria del género *Leptospira* que afecta sobre todo a los animales salvajes y domésticos, que sirven como fuente de infección para el hombre y presenta una epidemiología compleja. La Leptospirosis tiene la más amplia difusión entre las zoonosis a nivel mundial; está presente en todos los continentes excepto la Antártida y en los medios para el transporte de *Leptospira* se ha encontrado en casi todas las especies de mamíferos examinadas. Es una enfermedad ocupacional que afecta a personas que se dedican a la agricultura, minería, limpieza de desagües, y aquellos que tienen contacto con animales como matarifes y médicos veterinarios. En áreas tropicales están más expuestas a aguas y suelos contaminados con *Leptospira* haciendo que la infección sea más frecuente.

La región Lambayeque ha reportado casos sospechosos para Leptospirosis y actualmente las muestras para estudios confirmatorios son enviadas al centro referencial de salud (Lima) cuya demanda de atención es alta y existe un tiempo aproximado de 30 días a más para obtener los resultados. Existen diferentes métodos de laboratorio para el diagnóstico de Leptospirosis. El desarrollo de técnicas de biología molecular juega un papel importante en el diagnóstico temprano de Leptospirosis el cual está enfocado en la detección directa de secuencia de ADN de *Leptospira* en muestras clínicas.

Debido a que en años anteriores no se han registrado estudios ni casos confirmados de Leptospirosis y se desconoce la prevalencia real de esta enfermedad en trabajadores de camales de la región Lambayeque; motivo por el cual se planteó el presente estudio de investigación con el objetivo general de determinar la prevalencia de *Leptospira spp.* en muestras de orina de trabajadores del camal municipal de José Leonardo Ortíz, Octubre – Diciembre del 2017. utilizando la técnica molecular PCR.

## **CAPÍTULO II**

### **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

#### **2.1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS**

Se realizó una investigación epidemiológica en personas expuestas a cerdos infectados con *Leptospira*, donde concluyen que los trabajadores que laboran en zonas que tienen un potencial considerable para abrasiones en la piel y el contacto conjuntival con tejidos o fluidos corporales de cerdos, rara vez llevaba guantes protectores o gafas. A pesar de que no fue posible identificar una asociación significativa entre el uso de guantes o protección para los ojos y la seropositividad a dicha bacteria, el análisis de las estimaciones puntuales sugirió un efecto protector; donde se identificó una asociación significativa entre la seropositividad a *Leptospira* spp por no lavarse las manos después de trabajar con los cerdos. Posteriormente, al analizar los datos obtenidos de esta investigación, sugiere que algunas personas que tienen contacto con cerdos, necesitan las medidas de precaución necesarias para evitar su exposición directa a la sangre y líquidos corporales de estos animales infectados con *Leptospira* spp. (6).

Un estudio realizado en Colombia demostró que la población seropositiva a *Leptospira* estuvo principalmente en el rango de edades comprendidas entre 15 a 44 años, lo que se explica por el hecho de ser edades de mayor actividad laboral. Los resultados obtenidos en éste estudio coinciden con investigaciones anteriores que señalan en California que la leptospirosis tiene una mayor presentación en adultos jóvenes, rango en donde se concentra la mayoría de los individuos dedicados a actividades con gran exposición a la enfermedad (7)

Se experimentó que existe una prueba genérica muy sensible que es la reacción en cadena de polimerasa (PCR) que puede detectar *Leptospiras* cuando hay solo 10 de ellas. (8)

La positividad de anticuerpos contra *Leptospira* spp presentó una tendencia homogénea en los distintos grupos etarios, aunque el número de positivos fue mayor entre 31 a 40 años; sin embargo, hubo una tendencia creciente conforme aumentaba la edad y luego ésta disminuía, observándose mayor prevalencia en el grupo etáreo mayor de 30 años, hallazgo que podría atribuirse a un mayor período de exposición. Se encontró además que los matarifes tuvieron mayor prevalencia de infección que aquellos dedicados a otro tipo de actividad laboral, lo que puede ser debido al contacto directo de piel y mucosa con sangre y órganos de animales infectados **(10)**

En los Estados Unidos se reportó un caso en una médica veterinaria que se encontraba en proceso de lactación. Consumía leche de vaca infectándose con la *Leptospira* el serovar *hardjo*. A los 21 días de que aparecieron los signos clínicos en la madre, el niño, presentó fiebre, anorexia, irritabilidad y letargia. La leptospira serovar *hardjo* se aisló de una muestra de orina del niño. La transmisión ocurrió a través de la lactación. **(11)**

La susceptibilidad a la infección Leptospírica es igual en ambos sexos, en todas las edades y que el hombre por razones ocupacionales, está más expuesto que la mujer, lo cual explica que ésta enfermedad sea más frecuente en varones. **(12)**

Se consideran grupos de riesgos al personal que trabaja con animales o sus productos y a los que laboran en un medio ambiente contaminado como: ganaderos, veterinarios, trabajadores del matadero, procesadores de pescado y de aves, trabajadores agrícolas, especialmente los cañeros y de los arrozales, los que laboran en las canteras, mineros, constructores, trabajadores del alcantarillado y de las pisciculturas, servicios comunales, los militares en campaña y las movilizaciones agrícolas. En condiciones accidentales bañistas y excursionistas expuestos a fuentes de agua dulce naturales o artificiales infectadas. La enfermedad predomina en el sexo masculino por su perfil ocupacional y afecta con más frecuencia a los individuos de 15 a 40 años, pero se presenta en individuos de cualquier sexo y edad. **(13)**



En un trabajo de investigación se analizó la aplicabilidad de PCR para el diagnóstico de la leptospirosis humana comparando la sensibilidad de dos pares de cebadores en orina y sangre. PCR con G1 / G2 y los cebadores LP1 / LP2 era específica y capaz de detectar 10 pg del ADN por gel de agarosa y 1 pg por hibridación. Veintiún serovares, en representación de 20 serogrupos de leptospirosis patógenas, se amplificaron con cebadores G1 / G2. ADN de dos serovares no patógenas, Andamana y Patoc, no se amplificó. Para la hibridación, empleando una sonda de ADN de la mayoría de las leptospirosis prevalentes (serovares icterohaemorrhagiae Copenhageni, y Autumnalis) fue elegido de acuerdo con los títulos de microaglutinación en muestras de pacientes. Se observó que no todos los serovares se hibridaron con los productos de PCR de G1 / G2 y amplificación de cebador LP1 / LP2, lo que sugiere la heterogeneidad en la secuencia amplificada por estos cebadores. G1 / G2 amplificaciones-cebado de sangre y / o muestras de orina mostraron ser significativamente más sensible (57,6%) que los cebadores LP1 / LP2 (33,3%),  $P = 0,04$ , cuando se considera la positividad de los pacientes. Cuando se consideraron cada par de cebadores y sólo las muestras de orina, positividad de la PCR fue mayor para los cebadores G1 / G2 que para LP1 / LP2 ( $P = 0,007$ ). G1 / G2 presentó mayor sensibilidad en la orina que en la sangre, y LP1 / LP2 presenta una mayor sensibilidad en la sangre que en la orina, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. La positividad de la PCR por paciente utilizando ambos cebadores en las muestras de sangre y / u orina fue de 63,6%, con una eficiencia del 84,4%. PCR fue útil para pacientes sin microaglutinación anticuerpos detectables, para quien era capaz de diagnosticar nueve de cada 11 pacientes (81,8%). **(14).**

Los trabajadores de los mataderos están expuestos en forma directa a tejidos que pueden contener gran cantidad de *Leptospira* spp, lo que representa un factor de riesgo para contraer la enfermedad, siendo especialmente importante valorar éste factor con la manipulación con placentas porque es uno de los tejidos por los que éstas bacterias tienen afinidad. **(15)**

En Venezuela, se publicó un análisis detallado de los factores de riesgo en 41 pacientes con leptospirosis, confirmados con estudios serológicos y bacteriológicos, donde la infección predominó en adultos jóvenes con edad promedio de 31 años y la razón hombre: mujer fue de 11:1 **(16)**

Se realizó un estudio sobre “Detección molecular de *Leptospira spp.* en la orina del ganado en el norte de Irán” y los resultados que se obtuvieron mostraron que de las 98 muestras de orina, 525 pb fragmento del gen RR amplificó en 42 muestras (43%) incluyendo 19 de los 59 vacas (32,2 %) y 23 de los 39 toros (59%). Descubriéndose que no fue estadísticamente significativa la diferencia entre el sexo y los resultados de PCR ( $p = 0,009$ ). Demostrándose muestras de orina positivas a *Leptospira*. **(17)**

En un estudio de investigación en el estado Bolívar, Venezuela se evaluaron 128 muestras de suero de trabajadores de camales municipales utilizando la técnica cualitativa de ELISA, de la cual se obtuvieron como resultado la presencia anticuerpo de IgM anti *Leptospira* el 77.3 % como positivos. **(18)**

Las técnicas moleculares más utilizadas son las que se realizan mediante la detección de genes propios de especies patógenas; siendo rápidas, sensibles y específicas pudiendo utilizarse para la identificación de la enfermedad en estadios tempranos de la misma. Las técnicas empleadas son: la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la cual tiene la capacidad de amplificar de forma exponencial y específica una secuencia determinada del ADN. **(19)**

En un estudio realizado a nivel regional en pacientes febriles atendidos en el Hospital Regional Lambayeque en el año 2015 se reportó una frecuencia de Leptospirosis de 26,6% en un total de 143 personas evaluadas, utilizando la prueba de ELISA IgM. **(23)**

## **2.2. BASE TEÓRICA**

La Leptospirosis, es una zoonosis de gran impacto en la salud pública produciendo gran morbilidad y mortalidad a nivel mundial, principalmente en zonas tropicales. La enfermedad es causada por la infección con espiroquetas patógenas del género *Leptospira*, produce problemas reproductivos en animales de producción como el bovino, ovino, caprino, porcinos y equinos; los caninos son muy susceptibles a la enfermedad causándoles severas lesiones en riñones e hígado; mientras que, en gatos solo se ha reportado la enfermedad en infecciones experimentales. El humano y los animales se infectan a través de las mucosas y superficies lesionadas o heridas, y en menor medida por vía oral, al exponerse directamente con orina de animales infectados o con fuentes de agua contaminada como acequias, riachuelos, lagunas y ríos. Los roedores son los principales diseminadores o fuentes de contaminación, debido a que generalmente se infectan pero no padecen la enfermedad. Además, la incidencia de infección suele elevarse en época de verano, o con el incremento de lluvias e inundaciones. Por ello, es de gran importancia conocer y brindar la atención debida a esta zoonosis reemergente subestimada y así lograr un adecuado control y prevención, tanto en animales como en la población humana (5).

## **2.3. ETIOLOGÍA**

El género *Leptospira* pertenece a la familia *Leptospiraceae* y al orden *Spirochaetales* el cual también contiene las familias *Spirochaetaceae* y *Serpulinaceae*. La especie más importante desde el punto de vista de la medicina humana y veterinaria es *L. interrogans*. Según su composición antigénica, esta especie se divide en más de 20 serogrupos y éstos, a su vez, en más de 180 serovariedades. Todas las cepas poseen un antígeno somático común, sin embargo, difieren en la composición de sus antígenos de superficie, lo que explica el elevado número de cepas serológicamente heterogéneas. Por lo tanto, poseen antígenos de especie, de serogrupo y de serovariedad (3).

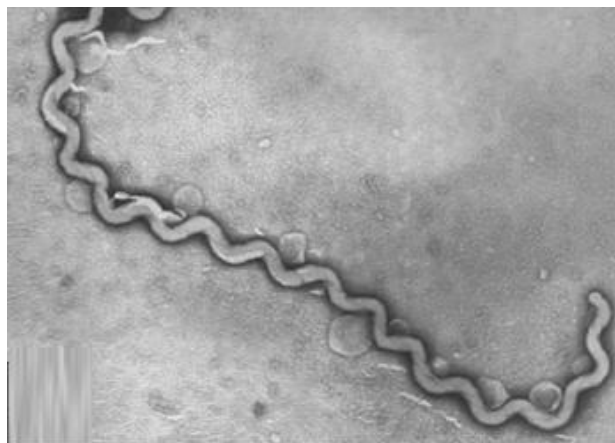
**Taxonomía:****Dominio:** Bacteria**Phylum:** Spirochaetes**Clase:** Spirochaetes**Orden:** Spirochaetales**Familia:** Leptospiraceae**Género:** Leptospira**Especie:** Leptospira interrogans**2.4. EPIDEMIOLOGÍA**

La Leptospirosis es una enfermedad de distribución mundial, presentándose más de 500,000 mil casos de Leptospirosis severa en humano, con un porcentaje de mortalidad mayor a 23%. Siendo más frecuente, en regiones tropicales, que favorecidas por las intensas lluvias, combinada con la densa población que vive en pobreza y la ausencia de servicios sanitarios, tanto en áreas rurales como urbanas, hacen que la enfermedad se mantenga y distribuya **(1)**.

Los animales infectados son los reservorios de las leptospiras, principalmente los roedores, que generalmente están infectados sin sufrir la enfermedad, diseminando la bacteria en los diferentes lugares de crianza o centros de producción animal, inclusive, parques en áreas urbanas, fuente principal para la infección de caninos y demás especies. Además, los desastres naturales, principalmente inundaciones, producen brotes o incrementan la incidencia de la enfermedad. En el Perú, se ha reportado muchos brotes y casos confirmados en humanos. Las Regiones de mayor incidencia son Loreto, Madre de Dios, Lima y Cusco. Se han realizados diversos estudios que corroboran la infección y enfermedad en diferentes especies animales de producción, silvestres y mascotas, de los cuales se han identificado y aislado diferentes serovares patógenos **(8, 13)**.

## 2.5. AGENTE

El agente bacteriano es una espiroqueta de doble membrana celular, gramnegativa de 0.1  $\mu\text{m}$  de diámetro y 6-20  $\mu\text{m}$  de longitud, poseen extremos en forma de ganchos y posee dos endoflagelos o flagelos periplásmicos que les confiere gran movilidad (20). Las leptospiras son aerobios obligados y crecen a una temperatura de 28-30 °C en medios líquidos o semisólidos que poseen nutrientes como vitaminas B1 y B12, ácidos grasos, aminoácidos y sales minerales. Además, los medios requieren de suero de conejo para su óptimo crecimiento (3).



**Figura 1. Leptospira**

**Fuente: Figueroa (26)**

## 2.6. TAXONOMÍA Y CLASIFICACIÓN

Las leptospiras son bacterias que se ubican en la División: Procariotas, Clase: Schizomicetes, Orden: Spirochaetales, Familia: Leptospiraceae, Género: Leptospira. Antes de 1989, el Género Leptospira se dividió en dos especies: Leptospira interrogans (cepas patógenas) y Leptospira biflexa (cepas saprofitas). Estos dos grupos difieren en sus requerimientos nutricionales y otras propiedades fenotípicas. Por ejemplo, el crecimiento de cepas patógenas es inhibido por el análogo de la purina 8-azaguanina, mientras que las cepas saprofitas crecen normalmente en presencia de este compuesto.

Las cepas patógenas tienen un tiempo de generación de alrededor de 20 h, y se considera que son bacterias de crecimiento lento, mientras que las cepas saprófitas crecen más rápidamente, alrededor de 5 h **(19)**. Actualmente el género *Leptospira* incluye 20 especies y más de 300 serovares, agrupados en 24 serogrupos **(20)**. Estas 20 especies a su vez se clasifican en tres grupos según su filogenia y patogenicidad en patógenas, intermedias y saprófitas **(19)**.

## **2.7. MODO DE TRANSMISIÓN Y FUENTES DE INFECCIÓN**

Las leptospiras se transmiten entre animales por contacto directo o indirecto. La transmisión directa ocurre principalmente con la entrada de leptospiras por vía inhalatoria o conjuntival, procedentes de gotas formadas por dispersión de la orina de animales infectados, la transmisión venérea no ha sido demostrada en algunas especies, aunque podría ser fundamental en algunas especies cuyos hábitats se encuentran en áreas de características o de densidad poblacional desfavorables para transmisión de la enfermedad de manera indirecta y se ha descrito la transmisión vertical, tanto transplacentaria como galactófora. Las heridas por mordedura o ingestión de tejidos infectados son también fuentes de infección directa. Los animales que se recuperan excretan el microorganismo por la orina en forma intermitente durante meses después de la infección. Las *Leptospiras* no se replican una vez que se hallan fuera del hospedador. La transmisión indirecta es la más frecuente en los brotes de la enfermedad, tanto en el hombre como en los animales y ocurre por contacto de la piel o mucosas con material contaminados con orina infectada; exposición de animales susceptibles a fuentes de agua, suelo, alimento contaminados. Aunque se comprobó que las espiroquetas sobreviven en insectos y otros hospedadores invertebrados, se desconoce la importancia de este hecho respecto a la transmisión de la enfermedad. La transmisión indirecta de leptospiras puede aumentar cuando los factores ambientales que favorecen la supervivencia de *Leptospira* son óptimos. Las *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola* y *L. grippityphosa* son los serotipos más frecuentes aislados de perros con leptospirosis. **(24)**.



**Figura 2. Transmisión de Leptospira**

**Fuente: Alfaro, Aranguren & Clavijo (27)**

## **2.8. PATOGENIE**

Las *Leptospiras*, pueden ingresar al hospedador a través de las mucosas, heridas o piel lesionada, luego de lograr acceder al torrente sanguíneo, colonizan preferentemente el riñón e hígado, debido a la gran cantidad de lípidos (ácidos grasos) que poseen estos órganos; y en menor frecuencia, colonizar el pulmón. La virulencia de esta bacteria se debe a la gran movilidad y habilidad de invadir tejidos por medio de sus proteínas de adhesión, como las proteínas de membrana externa (OMPs) y lipoproteínas, LipL32, LipL41 y LipL21. Además la producción de toxinas y enzimas, como son las hemolisinas SphH, proteínas formadoras de poros que poseen actividad esfingomielinasa y fosfolipasa, y la enzima catalasa (KatE), que conjuntamente con la respuesta inmune, desencadenan la lesión tisular produciendo, en infecciones severas, fallo renal y hepático, que en muchos casos conlleva a la muerte (3).

## **2.9. INMUNIDAD**

A pesar que las *Leptospiras* patógenas tienen la capacidad de evadir la fagocitosis y el sistema del complemento, la respuesta inmune inicial se realiza a través de la inmunidad innata, que es capaz de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como son los lipopolisacáridos (LPS) de las leptospiras, por medio de receptores tipo Toll (TLR), TLR2 y TLR4, que activan al factores nucleares, como NF- $\kappa$ B, que induce la producción de citoquinas inflamatorias (IL - 1 $\beta$ , IL-6, IL-8) al factor de necrosis tumoral (TNF). Finalmente logran montar una respuesta específica contra el serovar infectante, mediante la producción de anticuerpos IgM e IgG, además de la producción de interferón gama (IFN $\gamma$ ) y respuesta asociada a células T4 (CD4+) y T $\gamma\delta$ . Existen diversas vacunas contra la Leptospirosis **(28)**.

Las más difundidas, tanto en el humano como en las diferentes especies animales, son las vacunas inactivadas que son emulsiones conteniendo de 3 a 5 serovares. Cada serovar puede producir anticuerpos aglutinantes contra los diferentes serovares de un serogrupo. Por otro lado, se vienen realizando diversos trabajos, utilizando tecnologías genéticas recientes, con el objetivo de producir inmunidad contra todos los serovares o especies patógenas, así existen algunas vacunas recombinantes en proceso de evaluación **(29)**.

## **2.10. DIAGNÓSTICO**

La presentación clínica varía de acuerdo a la especie afectada y al serovar infectante. En bovinos, ovino, caprinos y porcinos, la enfermedad no produce signos clínicos evidentes, sin embargo, cursa con una infección crónica y puede producir abortos acompañados de leve fiebre, debilitamiento y anorexia. De manera similar, cursa la infección en equinos, pero frecuentemente causa uveítis llamada “ceguera lunar”. Los humanos y los perros suelen ser muy susceptibles a la infección por cualquier serovar de *Leptospira* spp., aunque se ha reportado cierta adaptación de los caninos al serovar canícola.



La infección, generalmente produce fiebre alta, ictericia, debilitamiento y puede conducir a la muerte por el fallo renal y hepático. Algunos hallazgos clínicos no específicos en sangre son los siguientes: Leucocitosis con desviación a la izquierda, trombocitopenia, elevación de los niveles de urea, creatinina, aminotransferasas, bilirrubina; en análisis de orina: Proteinuria, piuria, hematuria microscópica, cilindros granulares y hialinos. Para realizar un adecuado diagnóstico se necesita conocer la naturaleza de infección de la bacteria y respuesta inmune del hospedero. Las leptospiras no se tiñen bien con la coloración Gram, se puede realizar la evaluación directa, con un microscopio de campo oscuro, muestras de sangre, orina, del líquido o tejido placentario y el feto. Sin embargo, la sensibilidad de la prueba es baja, otros métodos de tinción, pueden incrementar la sensibilidad, como son la Inmunoperoxidasa, inmunofluorescencia, tinción de plata e hibridación in situ. La detección genética se realiza por técnicas moleculares, como el PCR, en sangre durante la primera semana de infección; en orina, a partir de la segunda semana o posterior a la producción de anticuerpos. La prueba de Microaglutinación (MAT), prueba de oro o Gold Standart, sigue siendo la mejor herramienta para la detección de los niveles de anticuerpos a los diferentes serogrupos de los serovares circulantes de acuerdo a cada ubicación o zona geográfica, en el cual títulos mayores a 1/100 (1/400 en regiones endémicas) acompañado de signos clínicos confirman el diagnóstico. El cultivo o aislamiento no es recomendable, debido al crecimiento lento de las leptospiras, aproximadamente de 6-20 semanas (20).

## **2.11. TRATAMIENTO**

Tanto en humanos y animales, los antibióticos son de gran utilidad en el tratamiento de la enfermedad. Se ha usado ampicilina, amoxicilina, eritromicina y azitromicina para el tratamiento de la Leptospirosis leve. Penicilina G y la doxiciclina se recomiendan para los casos severos. Es importante realizar el tratamiento completo y con las dosis adecuada, de acuerdo a la especie, debido a que, si bien, el paciente puede mostrar una recuperación completa, las leptospiras pueden permanecer en riñones, ser portadores y diseminadores de la enfermedad. El tratamiento es más de tipo sintomático pues se

requiere básicamente controlar la infección antes de los daños irreparables causados por las leptospiras (30). En pacientes deshidratados y con alteraciones renales como oliguria o anuria, debe aplicarse una terapia de fluidos con solución mixta (solución Hartmann y suero glucosado al 5%) para remplazar los líquidos perdidos y evitar una falla renal al restablecer el volumen circulatorio y la perfusión renal. El pronóstico es en general favorable y la tasa de mortalidad oscila del 5 a 20%. Para individuos expuestos a actividades de alto riesgo o los que visitan áreas endémicas por corto tiempo, una dosis semanal de doxiciclina de 200mg ha resultado eficaz (21).

## **2.12. EPIDEMIOLOGÍA DE LA LEPTOSPIROSIS HUMANA EN EL PERÚ**

Se han realizado diversos estudios en diferentes áreas y con muchas especies con el fin de tener noción de la frecuencia de presentación de esta enfermedad. Así, en nuestro país, el primer caso de Leptospirosis fue diagnosticado por Arce y Ribeyro (31), en un hospital en Lima. Más adelante, algunos veterinarios realizaron estudios serológicos en un vacuno, un cerdo y un perro, encontrándose positivos a *L. icterohemorrhagiae*, *L. pomona* y *L. canicola* respectivamente, pero no fueron tipificados en Centros de Prevalencia.

En 1955, el Instituto de Salud Pública de Lima realizó estudios epidemiológicos en ratas de desagües, gatos, perros y en cerdos sacrificados en el Frigorífico Nacional del Callao; el resultado fue el aislamiento de leptospiras pertenecientes a 5 serogrupos: *bataviae*, *tarassovi*, *canicola*, *pomona* e *icterohaemorrhagiae*, identificándose los serovares *paidjan*, *tarassovi* y *copenhageni*. Desde 1962 se investigó en otros departamentos del Perú y se aislaron 20 serogrupos, habiéndose identificado 43 serovares (25).

De acuerdo con los estudios realizados desde 1974 hasta 1988, de 871 pacientes hospitalizados con diagnóstico clínico probable de leptospirosis, se confirmaron 213 casos.

Por pruebas de laboratorio. La mayor casuística reportada fue en Lima (>90%), sobre todo de los distritos de Ate, Callao, San Martín de Porres, y Vitarte; debido a que hubo mayor sospecha clínica y disponibilidad de laboratorio para su confirmación. Las infecciones estuvieron relacionadas en su mayoría con la ocupación de los pacientes

como agricultores, albañiles, gasfiteros y militares, o con actividades recreacionales y accidentes, donde existió contacto con agua contaminada o reservorios (silvestres o domésticos). Mediante la serología se hallaron anticuerpos contra los serogrupos Icterohaemorrhagiae (74%), Canicola (6%), Hebdomadis (2%), Australis (2%), Pomona (2%), Bataviae (1%), Tarassovi (0,5%) y Andamana. En 7% de los casos no se pudo determinar el serogrupo infectante, debido posiblemente a infecciones con serovares no incluidos en la batería de antígenos. Se lograron aislar leptospiros del serogrupo Icterohaemorrhagiae diez, Pomona uno, Hebdomadis uno, Tarassovi uno y del serovar Andamana uno. Cerca de 10% de los casos notificados, fueron las formas graves, que representaron la mayoría de los que requirieron hospitalización, tanto adultos como niños. La mortalidad reportada fue mayor a 4%, las causas principales de muerte fueron insuficiencia renal aguda, encefalitis, neumonitis intersticial y hemorragia digestiva. Los decesos se produjeron entre el segundo y octavo día de enfermedad. (13).

## **2.13. EPIDEMIOLOGÍA DE LA LEPTOSPIROSIS HUMANA EN EL PERÚ 1994 – 2004**

A partir de la base de datos del Laboratorio de Leptospirosis, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud; se analizaron todos los casos (probables y confirmados) desde el año 1994 hasta el 2004, que llegaron para su confirmación diagnóstica

Es importante tener en cuenta que cuando se introdujo el método de ELISA IgM y se comenzó a realizar capacitaciones y transferencia tecnológica de este método a los laboratorios regionales, los casos probables y confirmados de leptospirosis han aumentado; por lo que en la actualidad en muchos departamentos es considerada como una de las principales causas de enfermedad febril por encima de otras infecciones endémicas, incluso considerado más importante que el dengue. Desde 1998 se comenzaron a notificar brotes en la costa, sierra y selva, y desde el 2001 son cada vez más frecuentes; debido también al crecimiento de las poblaciones que se establecen en nuevas zonas alterando el ecosistema (particularmente en la selva), exponiendo a sus animales domésticos a un medioambiente contaminado con leptospiros.

Asimismo, los hábitos y costumbres de la población, y el saneamiento deficiente propician que se presente en la gran mayoría de regiones del Perú.

Desde 1994 hasta el año 2004 se han confirmado casos en 18 de las 24 regiones del Perú, pertenecientes a las tres áreas geográficas (costa, sierra y selva). La altitud en la que se han encontrado va desde los 25 hasta 3500 msnm. La región que más casos confirmados tuvo fue Loreto(21,6%), seguido de Cusco (14,8%), Madre de Dios(11,6%), Lima (11,1%), Cajamarca (8,9%), Ucayali(7,7%), Piura (5,0%), Lambayeque (4,8%), Huánuco(3,9%) y Junín (3,0%); las regiones que reportaron menos de 2% fueron Ancash, Ayacucho, Amazonas, San Martín, Huancavelica, Pasco, Tumbes y La Libertad. Las regiones en las que no se encontraron, ni notificaron casos fueron Ica, Arequipa, Moquegua, Tacna y Puno, pese a que en estudios previos se había aislado leptospiras en animales domésticos, silvestres así como en muestras de suelo y agua en estas regiones. La mayor cantidad de casos se han registrado en zonas de selva, especialmente en las provincias de Maynas y Alto Amazonas (Loreto), San Martín, Rioja, Moyabamba, Mariscal Cáceres y Tocache (San Martín), Coronel Portillo y Padre Abad (Ucayali), Leoncio Prado y Huamalies(Huánuco), Manu, Tahuamanu y Tambopata (Madre de Dios), La Convención (Cusco), La Mar y Huanta (Ayacucho),La Merced y Satipo (Junín), Bagua, Uctubambay Condorcanqui (Amazonas), y Oxapampa (Pasco),En la costa se han presentado frecuentemente casos en las provincias de Tumbes(Tumbes), Ayabaca, Sullana, Morropón, Piura y Huancabamba (Piura), Lambayeque, Chiclayo y Ferreñafe (Lambayeque), en Trujillo (LaLibertad), y en Santa, Casma y Huarney (Ancash). Sin embargo, destaca la gran cantidad de casos encontrados en la región Lima; tanto en las provincias de Huaral (Chancay y Huaral) y Huaura (Huacho) al norte, como Cañete en el sur, como en Lima Metropolitana y Calla o en diversos distritos Los Olivos, Puente Piedra, particularmente en ribereños del río Rimac (Chosica, Ate Vitarte, San Martin de Porres y Ventanilla). **(13)**

En la sierra destacan particularmente las provincias de Chota, Jaén, Santa Cruz y San Miguel (Cajamarca), Huaraz, Caraz y Huaylas (Ancash), Huancavelica (Huancavelica), Huancayo (Junín), y Huamanga (Ayacucho). **(25)**

## **CAPÍTULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

El presente trabajo de investigación se realizó entre Octubre – Diciembre del 2017 en trabajadores del camal municipal del distrito de José Leonardo Ortíz, provincia Chiclayo, departamento Lambayeque.

#### **3.2. MUESTRA BIOLÓGICA**

Se trabajó con muestras de orina correspondiente a 42 trabajadores del Camal Municipal José Leonardo Ortíz, de diferentes edades, ocupación y sexo.

#### **3.3. MATERIALES**

##### **3.3.1.- Materiales para recolección**

- ❖ Frascos para muestra.
- ❖ Cajas térmicas.
- ❖ Hielo refrigerante.

##### **3.3.2. Materiales para la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)**

- ❖ Agitador vórtex orbital.
- ❖ Soporte para pipetas automáticas.
- ❖ Micropipetas.
- ❖ Cabina de bioseguridad.
- ❖ Centrífuga Thermo CL10.
- ❖ Microcentrífuga.
- ❖ Transiluminador Benchtop 3UV.

- ❖ Refrigeradora HELMER 4°C.
- ❖ Agitador MAXQ.
- ❖ Balanza analítica.
- ❖ Ph-metro.
- ❖ PowerPac HC Power – BIORAD.
- ❖ Termociclador.
- ❖ Maño María Memmert.
- ❖ Pharos FX Plus – BIORAD.
- ❖ Horno.
- ❖ Estufa.
- ❖ Computadora.
- ❖ Montaje del Gel de Agarosa.
- ❖ Tubos de 1.5 ml.
- ❖ Tubos de 2.0 ml.
- ❖ Tubos para centrifugar.
- ❖ Puntas pequeñas, medianas y grandes.
- ❖ Agua destilada.
- ❖ Microtubos.
- ❖ Bikers.

### **3.3.3. VESTUARIO Y BIOSEGURIDAD**

- ❖ Mandil descartable talla M.
- ❖ Guantes de latex talla M caja x 100 und.
- ❖ Gorras tipo gusano.
- ❖ Recipientes de bioseguridad para punzocortantes.
- ❖ Bolsas autoclavables rojas bioseguridad pequeñas.
- ❖ Mascarillas descartables caja x 50 und.
- ❖ Mandil blanco.

### **3.3.4. REACTIVOS**

- ❖ Buffer 5X
- ❖ Primers L3 F
- ❖ Primers L4 R
- ❖ DNTPs
- ❖  $MgCl_2$
- ❖  $H_2O$  PCR
- ❖ Taq Polimerasa
- ❖ Buffer de lisis de Glóbulos Blancos
- ❖ 2-Mercaptoetanol
- ❖ SDS 10%
- ❖ Acetato de Na 1.5 M
- ❖ Isopropanol
- ❖ Etanol 70%
- ❖ Buffer Load bye 6X
- ❖ Marcador de Peso Molecular 100pb
- ❖ Buffer TAE 1X
- ❖ Gel de Agarosa
- ❖ Bromuro de Etidio

## **3.4. METODOLOGÍA**

### **3.4.1. Toma de Muestras**

Con la finalidad de tener contacto con los trabajadores del camal, se programó una charla, a fin de explicar aspectos importantes de Leptospirosis y la manera adecuada en la cual ellos deben recolectar la muestra de orina y transportarla hacia su centro de trabajo.

A cada participante se le entregó una ficha de datos la cuál fue llenada por los investigadores. (Anexo 1)

Así mismo a cada participante se le entregó el consentimiento informado, aceptando participar de este trabajo de investigación. (Anexo 2)

Después de la charla de sensibilización, a cada trabajador se le entregó un frasco estéril para que recolecte su muestra de orina y fue entregada el día siguiente a los investigadores. Cada frasco estuvo debidamente rotulado con el nombre del trabajador, fecha de recolección y camal de procedencia.

Se recolectaron los frascos de las muestras de orina debidamente rotuladas y fueron colocadas a las cajas térmicas para su conservación. Luego inmediatamente fueron trasladadas al laboratorio de Biología Molecular del Hospital Regional Lambayeque.

### **3.4.2. Análisis de la muestra**

Las muestras fueron analizadas y procesadas en el laboratorio de Biología Molecular del Hospital Regional Lambayeque, mediante la Prueba Molecular de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).

#### **3.4.2.1 Extracción de ADN en Orina**

##### **MÉTODO DE SALTING OUT**

- a) Se extrajo 12 ml de cada muestra en tubos debidamente rotulados. Luego se llevaron a la centrifuga a 4500 rpm por 10 minutos. Después se vertió el sobrenadante quedando un poco de cada muestra en cada tubo. Esto para eliminar partículas de gran tamaño (células del epitelio de vejiga, cristales urinarios etc.). Éste paso se repitió 2 veces para cada muestra, quedando en el tubo sólo el sedimento.



- b) De cada tubo centrifugado, se retiró el sedimento (pellet) con la ayuda de una micropipeta y se llevó a unos pequeños tubos para micro centrífuga de 1.5 ml debidamente rotulados.
- c) A cada tubo rotulado se le agregó 360 uL de Buffer de Lisis de Glóbulos Blancos y 3 uL de 2-mercaptoetanol, se llevó luego a baño maría a 56°C por 1 hora y cada 10 minutos se llevó al vórtex.
- d) Se agregó 90 uL de Acetato de Sodio a cada tubo rotulado, luego se llevó al vórtex y después a la microcentrífuga a 12000 rpm/ 5 minutos.
- e) Luego se recupera el sobrenadante y se vierte en otros tubos rotulados de 1,5 ml y se repite el mismo paso anterior.
- f) A cada tubito se le agrega 200 uL 2-propanol. Esto es para precipitar el ADN.
- g) Luego centrifugar durante 5 minutos por 12 000 prm. Encontramos pellet (sedimento) que viene hacer el ADN y luego se elimina el sobrenadante.
- h) Después se vierte etanol al 70% (200 uL) a cada tubito. Luego se agita y se llevó a la microcentrifuga y se elimina el sobrenadante y queda el pellet que es el ADN.
- i) Por último se resuspenden agregándole 25 uL de agua PCR (H<sub>2</sub>O PCR) a cada tubito. Finalmente se llevan a unas cajas racks para congelación a 4°C.

### 3.4.2.2. PREPARACIÓN DEL MASTER MIX

	Conc. Inicial	Conc. Final	Vol. Inicial	Vol. Final
<b>Buffer 10x</b>	10	1	1.25	<b>57.5</b>
<b>Primer F 10mM</b>	10	0.2	0.25	<b>11.5</b>
<b>Primer R 10mM</b>	10	0.2	0.25	<b>11.5</b>
<b>Dntps 5mM/c</b>	5	0.2	0.5	<b>23</b>
<b>MgCl<sub>2</sub> 25mM</b>	25	1.5	0.75	<b>34.5</b>
<b>Taq 5U/ul</b>	5	0.025	0.0625	<b>2.875</b>
<b>DNA</b>		3/Rx		
<b>Agua PCR</b>			6.4375	<b>296.125</b>
<b>Volumen Final (uL)</b>			<b>9.5</b>	<b>437</b>

### 3.4.2.3 AMPLIFICACIÓN

Es la multiplicación exponencial de una secuencia específica de ADN bicatenario, sintetizando grandes cantidades de un segmento específico de ADN a partir de cantidades inferiores a 1 µg del ADN de muestra (y en teoría a partir de una sola molécula de ADN). Comprende varios ciclos divididos en tres etapas (desnaturalización, hibridación o anillamiento y extensión del cebador).

### 3.4.2.4. PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA AL 2%

- En un matraz, verter la cantidad de 180 ml de Buffer TBE 1X para completar el volumen del molde a rellenar con el gel.
- Medir la cantidad de agarosa al 2%. Es decir que se requiere 3.6 gr para los 180 ml. De buffer. Recordar que a más concentración, mayor resolución.
- Se procede a mezclar la agarosa con el Buffer TBE 1X y fusionar los componentes para obtener el gel. Luego es llevado al microondas ya que se

necesita una fuente de calor que permita fundir la agarosa y realizar el proceso más rápidamente.

- d) Se enfría el gel para poder verterlo en el molde ya preparado. Siempre hay que acordarse de poner unos límites en los bordes del molde para que no se disperse el gel por la mesa y colocar el peine que formara los pocillos. En unos minutos, al enfriarse del todo, se tiene el gel polimerizado.
- e) Por último, ya enfriado el gel, se introduce en la cubeta que contiene el buffer de corrida, a la misma concentración que el que se ha utilizado para generar el gel, y ya sólo queda cargar las muestras y empezar la corrida electroforética.

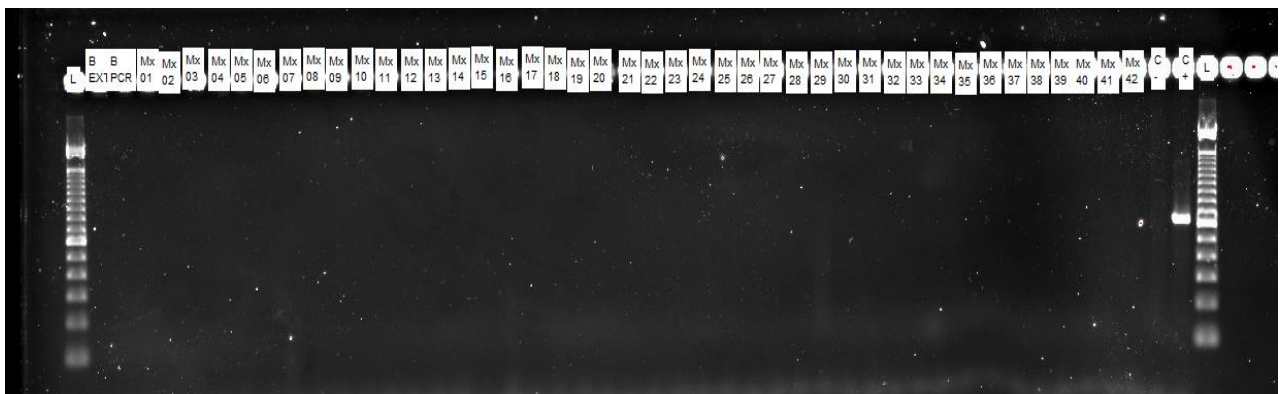
#### **3.4.2.5. ELECTROFORESIS**

Los productos de la amplificación por PCR fueron visualizados bajo una electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X y visualizados con bromuro de etidio o SyBR GREEN.

##### **Proceso:**

La corrida electroforética se realizó en gel de agarosa al 2%, se utilizó en el primer pocillo 3 ul del Ladder “Marcador de peso molecular” (100 pb), luego se utiliza para cada muestra 2ul de buffer de corrida o Loading buffer 6X y 10 ul del producto de PCR, el voltaje aplicado es de 120V durante 10 minutos, luego se aumenta el voltaje a 180 V durante 50 minutos, y por último se disminuye a 120V durante 10 minutos.

Después se retiró el gel y fue llevado a un recipiente y es teñido empleando bromuro de etidio durante 15 minutos y luego se Fotodocumentó utilizando el Pharos Fx Plus de BioRad.



**Figura 3. Electroforesis de gel de agarosa al 2% - Lesptospira**

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

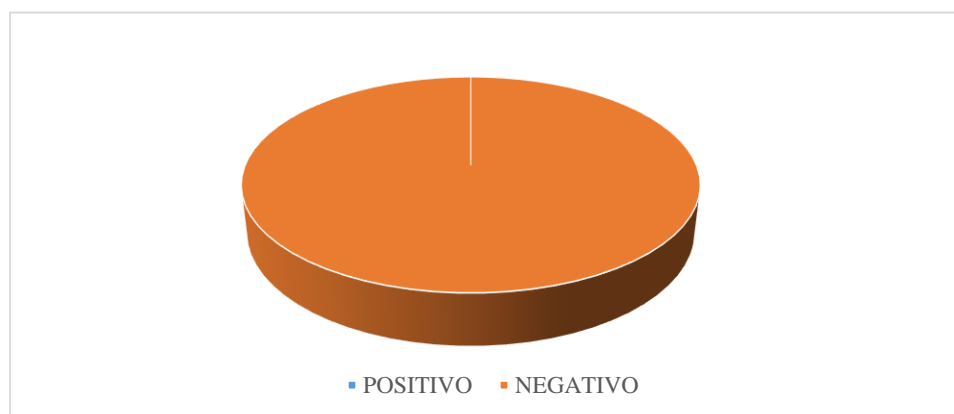
#### 4.1. PREVALENCIA DE LEPTOSPIROSIS EN TRABAJADORES DEL CAMAL MUNICIPAL DE JOSÉ LEONARDO ORTÍZ, OCTUBRE – DICIEMBRE DEL 2017.

El Cuadro y Gráfico 1 revelan la prevalencia de Leptospirosis mediante la técnica molecular PCR en muestras de orina de trabajadores del camal municipal de José Leonardo Ortiz, Octubre – Diciembre 2017; observándose que ningún trabajador fue portador a *Leptospira spp.* del total de muestras realizadas.

**Cuadro 1:** Prevalencia de Leptospirosis mediante la técnica molecular PCR en muestras de orina de trabajadores del camal municipal de José Leonardo Ortiz, Octubre – Diciembre del 2017.

OBSERVACIONES	POBLACION MUESTREADA		RESULTADOS				PREVALENCIA %
		POSITIVOS		NEGATIVOS			
		N°	%	N°	%		
GEN LEPTOSPIRA	42	0	0.00	42	100.00	0.00	

**Fuente:** Investigadores.



**Gráfico 1.** Resultado del estudio de prevalencia de Leptospirosis diagnosticado mediante la técnica molecular PCR en muestras de orina de trabajadores del camal municipal de José Leonardo Ortiz, Octubre – Diciembre del 2017.

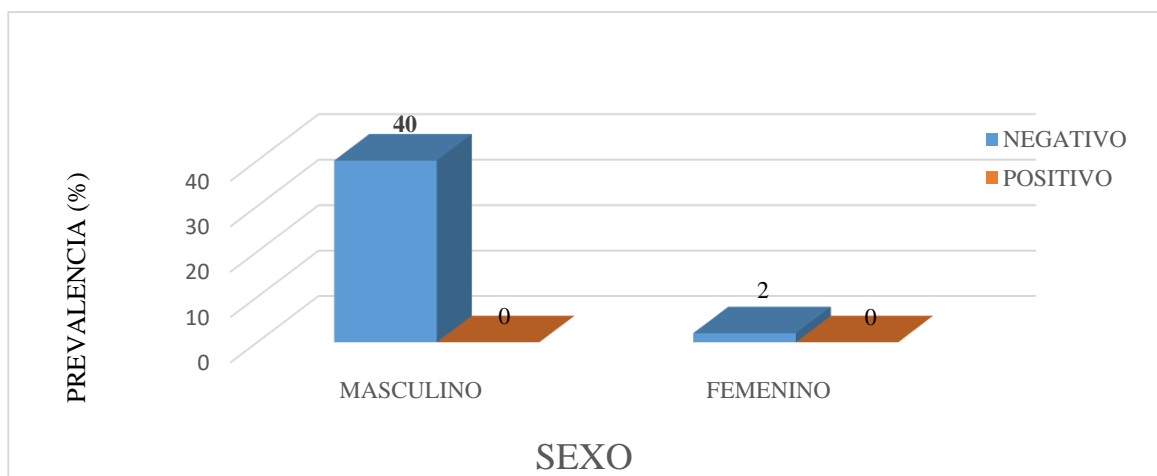
#### 4.2. PREVALENCIA DE LEPTOSPIROSIS SEGÚN SEXO EN TRABAJADORES DEL CAMAL MUNICIPAL DE JOSÉ LEONARDO ORTIZ, OCTUBRE – DICIEMBRE DEL 2017

El Cuadro y Gráfico 2 revelan la prevalencia de Leptospirosis según sexo diagnosticado mediante la técnica molecular PCR en muestras de orina de trabajadores del camal municipal de José Leonardo Ortiz, Octubre – Diciembre 2017; observándose que ambos sexos fueron negativos a la prueba del PCR.

**Cuadro 2:** Prevalencia de Leptospirosis según sexo diagnosticado mediante la técnica molecular PCR en muestras de orina de trabajadores del camal municipal de José Leonardo Ortiz, Octubre – Diciembre del 2017.

SEXO	POBLACION MUESTREADA	LEPTOSPIRA		
		POSITIVOS	NEGATIVOS	PREVALENCIA %
FEMENINO	2	0	2	0.00
MASCULINO	40	0	40	0.00
TOTAL	42	0	42	0.00

**Fuente:** Investigadores.



**Gráfico 2.** Resultado del estudio de prevalencia de Leptospirosis según sexo diagnosticado mediante la técnica molecular PCR en muestras de orina de trabajadores del camal municipal de José Leonardo Ortiz, Octubre – Diciembre del 2017.

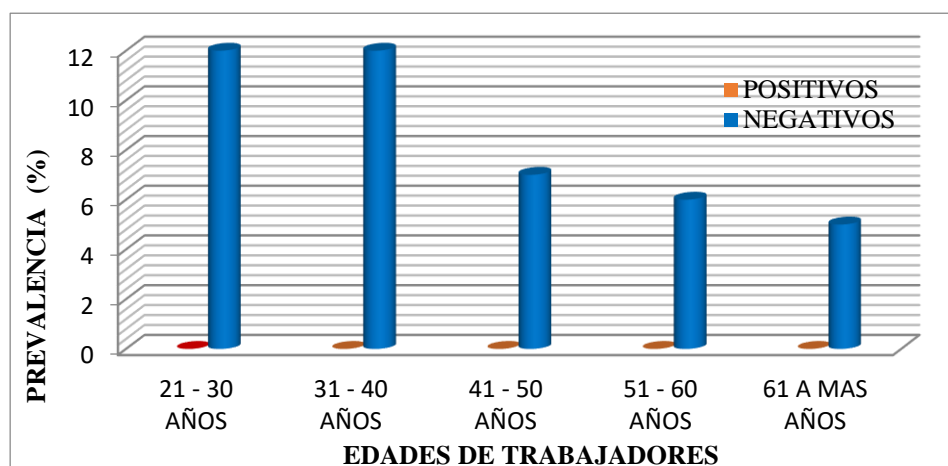
#### 4.3.PREVALENCIA DE LEPTOSPIROSIS SEGÚN LA EDAD EN TRABAJADORES DEL CAMAL MUNICIPAL DE JOSÉ LEONARDO ORTIZ, OCTUBRE – DICIEMBRE DEL 2017

El Cuadro y Gráfico 3 revelan la prevalencia de Leptospirosis según edad diagnosticado mediante la técnica molecular PCR en muestras de orina de trabajadores del camal municipal de José Leonardo Ortiz, Octubre – Diciembre 2017; observándose todas las edades fueron negativos a la prueba PCR.

**Cuadro 3.** Prevalencia de Leptospirosis según edad diagnosticado mediante la técnica molecular PCR en muestras de orina de trabajadores del camal municipal de José Leonardo Ortiz, Octubre – Diciembre del 2017.

EDADES	TRABAJADORES MUESTREADOS	LEPTOSPIRA		
		POSITIVOS	NEGATIVOS	PREVALENCIA %
21 - 30 AÑOS	12	0	12	0.00
31 - 40 AÑOS	12	0	12	0.00
41 - 50 AÑOS	7	0	7	0.00
51 - 60 AÑOS	6	0	6	0.00
61 A MAS AÑOS	5	0	5	0.00
TOTAL	42	0	42	0.00

Fuente: Investigadores.



**Gráfico 3.** Resultado del estudio de prevalencia de Leptospirosis según edad diagnosticado mediante la técnica molecular PCR en muestras de orina de trabajadores del camal municipal de José Leonardo Ortiz, Octubre – Diciembre del 2017.

#### 4.4. PREVALENCIA DE LEPTOSPIROSIS SEGÚN LA OCUPACIÓN EN TRABAJADORES DEL CAMAL MUNICIPAL DE JOSÉ LEONARDO ORTIZ. OCTUBRE – DICIEMBRE DEL 2017

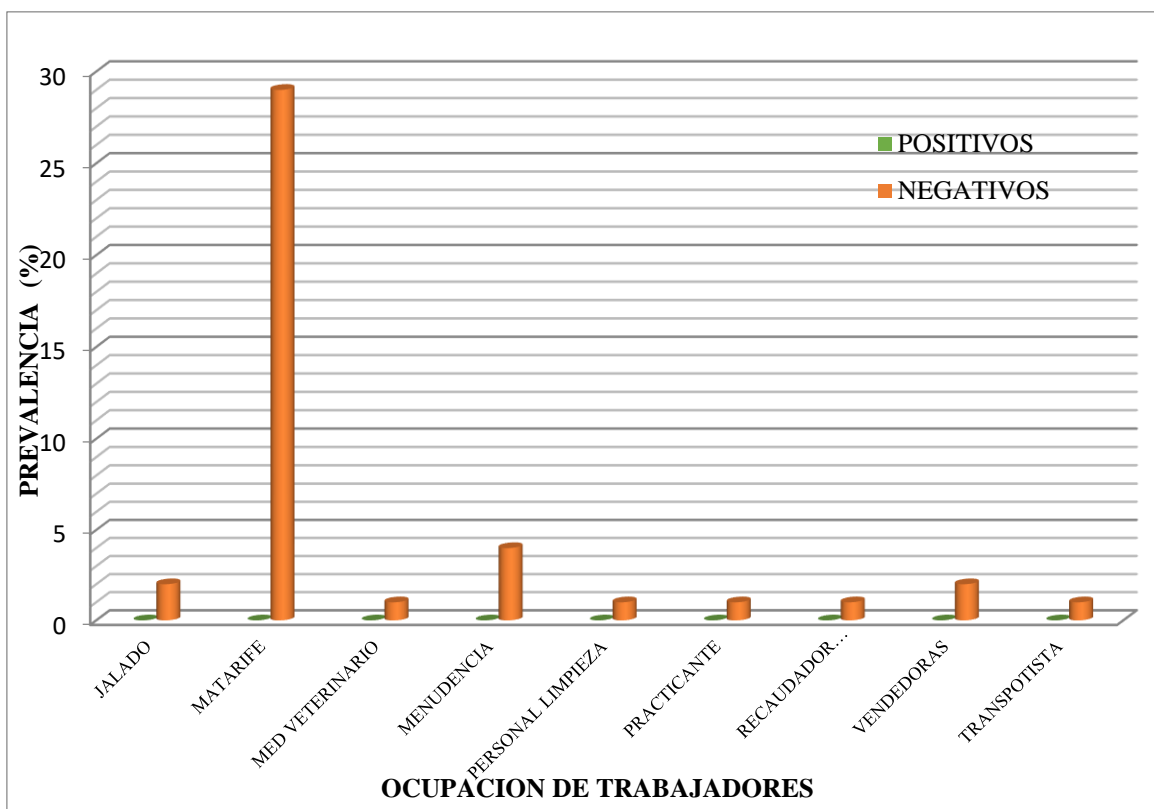
El Cuadro y Gráfico 4 revelan la prevalencia de Leptospirosis según ocupación diagnosticado mediante la técnica molecular PCR en muestras de orina de trabajadores del camal municipal de José Leonardo Ortiz, Octubre – Diciembre 2017; observándose que todos los trabajadores muestreados (ocupación) resultaron negativos a la prueba PCR.

**Cuadro 4.** Prevalencia de Leptospirosis según ocupación diagnosticado mediante la técnica molecular PCR en muestras de orina de trabajadores del camal municipal de José Leonardo Ortiz, Octubre – Diciembre del 2017.

EDADES	TRABAJADORES MUESTREADOS	LEPTOSPIRA		
		POSITIVOS	NEGATIVOS	PREVALENCIA %
JALADOR	2	0	2	0.00
MATARIFE	29	0	29	0.00
MED VETERINARIO	1	0	1	0.00
MENUDENCIA	4	0	4	0.00
PERSONAL LIMPIEZA	1	0	1	0.00
PRACTICANTE	1	0	1	0.00
RECAUDADOR MUNICIPAL	1	0	1	0.00
VENDEDORAS	2	0	2	0.00
TRANSPOTISTA	1	0	1	0.00
TOTAL	42	0	42	0.00

**Fuente:** Investigadores.





**Gráfico 4.** Resultado del estudio de prevalencia de Leptospirosis según ocupación diagnosticado mediante la técnica molecular PCR en muestras de orina de trabajadores del camal municipal de José Leonardo Ortíz, Octubre – Diciembre del 2017.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio de investigación, permitió determinar la Prevalencia de *Leptospira* spp. en muestras de orina de trabajadores del camal municipal de José Leonardo Ortiz utilizando la técnica molecular PCR, revelando una prevalencia de 0%, este hecho puede ser atribuido probablemente porque la mayor parte de los casos de leptospirosis presentan una sintomatología inespecífica o leptospirosis anictérica o asintomática. Esto es consistente con lo hallado en otros estudios de seroprevalencia en áreas donde la infección es endémica, con elevadas tasas de infección en individuos con sintomatología inespecífica (18). Otros componentes que podrían influir a la disminución de la prevalencia de esta enfermedad en trabajadores de camales es que realicen medidas de prevención y control al ingerir antibióticos, antipiréticos y antiinflamatorios para alguna sintomatología pasajera y así eliminar indirectamente la bacteria que quizás estuvo localizada en los riñones en algún tiempo.

La prevalencia de Leptospirosis del 0% de este estudio de investigación es inferior comparada con la prevalencia del 77.3% obtenido por **Rodríguez y Torres (18)** en el estado de Anzoátegui, Venezuela; ésta diferencia se debe básicamente al uso de la técnica cualitativa de ELISA utilizando suero como muestra para su diagnóstico. A diferencia de la técnica molecular PCR utilizando orina como muestra para este estudio de investigación, donde la excreción de *Leptospiras* en orina es esporádica y variable en cantidad, pudiendo no encontrarse espiroquetas en las muestras.

Es importante tener en cuenta también que la prueba molecular PCR utilizada, es una prueba muy sensible y específica para la detección del material genético de cualquier enfermedad y es recomendada por el INS.

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES**

De los resultados obtenidos en el presente estudio de investigación, se puede concluir que:

- ❖ No se encontró la presencia de *Leptospira spp*, mediante la prueba molecular PCR, en trabajadores del camal municipal José Leonardo Ortíz, durante el período comprendido entre Octubre y Diciembre del 2017, siendo su prevalencia igual a 0 % .

## **CAPÍTULO VI**

### **RECOMENDACIONES**

- 1.** Realizar cultivos y pruebas serológicas (MAT, ELISA) que permitan establecer si los trabajadores de camales tienen anticuerpos que indiquen la exposición previa a *Leptospira spp.*
- 2.** Apoyar las estrategias y procesos de medidas preventivas y de educación a la comunidad propuestas por el Instituto Nacional de Salud.
- 3.** Realizar estudios durante época de lluvia, para determinar si en esta región, las lluvias son factores favorables o no a la diseminación de esta enfermedad.

## **CAPÍTULO VII**

### **BIBLIOGRAFÍA**

1. Balassiano. I; Vital. J; Sensitive Real-Time PCR Detection of Pathogenic *Leptospira* spp. and a Comparison of Nucleic Acid Amplification Methods for the Diagnosis of Leptospirosis. PLoS One. 2014; 9(11): e112356.
2. Acha P, Szyfres. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3a ed. O.P.S. , Washington DC, EE.UU. 2001. Pp 175-185
3. Adler. B; De la Peña Moctezuma. A. Detección de *Leptospira santarosai* y *L. kirschneri* en bovinos: nuevos aislados con potencial impacto en producción bovina y salud pública. Vet. Méx vol.42 no.4 México oct./dic. 2011.
4. Faine. S. Guidelines for the control of leptospirosis. WHO publication 1982. N° 67
5. Siuce. J. Identificación de Serogrupos Patógenos de *Leptospira* en Canes Domésticos. Rev Inv Vet Perú 2015; 26(4): 664-675
6. Campagnolo. E; Analysis of the 1998 outbreak of leptospirosis in Missouri in humans exposed to infected swine. J Am Vet Med Assoc 2000; 216(5): 676-82.
7. Meites. E; Jay. Reemerging leptospirosis in California. Emerg Infect Dis 2004; 10: 406-411.
8. Matthias. M; Nally. J. Identificación de serogrupos patógenos de *Leptospira* en canes domésticos. Rev. investig. vet. Perú vol.26 no.4 Lima dic. 2015.

9. Watanabe. H; Leptospirosis vaccines: past, present, and future. J Postgrad Med. 2005 Jul-Sep;51(3):210-4.
10. Martone. W; Kaufmann. A; Leptospirosis in humans in the United States, From the Center for Disease Control. News. J infect Dis 1979; 140(6): 1020-2.
11. Songer. J; Thiermann. A; Isolation of leptospires from genital tracts and kidneys of aborted sows. Vet. Rec. 1988 (118), 294, 295.
12. Halbrohr. J. Ecología y Epidemiología de la Leptospirosis: Algunas consideraciones sobre la situación en Venezuela. III Cong. Ven. Microbiol. Caracas. 1982. Pp 14
13. Céspedes. M; Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Reemergente. Rev Peru Med Exp Salud Publica 2005. 22(4),
14. Fonseca. C; Polymerase chain reaction in comparison with serological tests for early diagnosis of human leptospirosis. Trop Med Int Health 2006b;11: 1699–707.
15. Schuring. G. Erradicación de la brucelosis y características principales de la vacuna Brucella abortus cepa RB51. Memorias del Simposium Internacional de Brucelosis. Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad Centrooccidental “Lisandro Alvarado”. Maracay. Venezuela 1999. 26 al 27 de Mayo.
16. Torres. R; Mondolfi. G; Castillo. A; Historia natural de la leptospirosis en Venezuela. Bol Venez Infectol. 1989. 1: 27 – 29.
17. Jafari. D; Shahbazkia. A; Evaluation of pathogenic serovars of *Leptospira interrogans* in dairy cattle herds of Shahrekord by PCR. Iran. J. Microbiol. 2011;3:135–139.
18. Rodríguez. I; Torres. L; Estudio serológico de Leptospirosis en mataderos del estado Bolívar y Soledad, estado Anzoátegui. [Tesis Pre-grado]. Bolívar: Universidad de Oriente; 2010. 53 p.

19. Vijayachari. P; Sehgal. S; Seroprevalencia de la leptospirosis entre la población de alto riesgo de las islas Andaman, India. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Feb; 74 (2): 278 - 83.
20. Cerqueira. G; Picardeau. M.; A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol.* 2009 Sep;9(5):760-8.
21. Galloway. R; Levett. P; Application and validation of PFGE for serovar identification of *Leptospira* clinical isolates *PLoS Negl Trop Dis*, 4 (2010), pp. 1-7
22. Younes. M; *Leptospira* and Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2012; 2012: 317950.
23. Silva. H; Llatas. D; Campos. M; Aguilar. F; Mera. K; Valderrama. M; Frecuencia de leptospirosis y características socio-demográficas en pacientes febriles del norte del Perú. *Rev Chilena Infectol.* 2015; 32 (5): 530-535.
24. Craig E.; Greene, C.E.. *Enfermedades infecciosas.* 2da Edición. McGraw- Hill Interamericana. México. 1993: 523 – 534 pp.
25. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2008. *Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control* / Organización Mundial de la Salud. Recuperado, [http://int/eng/normes/mmanual/A\\_00041.html](http://int/eng/normes/mmanual/A_00041.html)
26. Figueroa, M.; *Enfermedades infecciosas de los animales domésticos en Centro América.* Editorial Universal Estatal a distancia San José, Costa Rica, 1984: 173-194,
27. Alfaro, C.; Aranguren, Y.; Clavijo, A. et al. Prevalencia serológica de leptospirosis en ganado doble propósito del noreste de Monagas, Venezuela. *Zootecnia Tropical*, v.22, n.2, p.117-124, 2004.
28. Goncalves de Albuquerque C, Burth P, Silva A, Younes M, Castro-Faria-Neto HC, et al. *Leptospira* and Inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2012: 1-11

- 29.** Koizumi, N. y H. Watanabe,.Vacunas contra la leptospirosis : pasado, presente y futuro. J. Postgrad Med., 2005. 51: 210-214.
- 30.** McDonough, L. The emergence of leptospirosis as a serious canine infectious disease in the Northeastern, USA Department of Population Medicine and Diagnostic Science, Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, New York, USA.; 1999. 114.
- 31.** Arce, J., y Ribeyro, R. E. Sobre un caso de espiroquetosis ictero-hemorrágica. La Crón. méd., Lima, 1917. 34: 355-360 pp.



# **ANEXOS**

## ANEXO 1. FICHA DE DATOS DEL TRABAJADOR

### FICHA DE DATOS DEL TRABAJADOR (ANEXO 1)

#### DATOS PERSONALES

NOMBRES	APELLIDOS	EDAD

#### DATOS LABORALES

1. ¿Trabaja en más de un camal?

SI ☐ NO ☐

2. ¿Ha presentado cortes en la piel durante el beneficio de los animales?

SI ☐ NO ☐

3. ¿Qué función cumple en el camal?

.....



## ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO

### Consentimiento Informado

**Denis Rolando Serquén Alarcón (Investigador Principal)**

Este documento de consentimiento informado está dirigido a trabajadores del Camal Municipal José Leonardo Ortiz de la ciudad de Chiclayo, y que se les invita a participar en la investigación “Prevalencia de *Leptospira spp* mediante la detección molecular en muestras de orina de trabajadores del camal municipal José Leonardo Ortiz, Octubre – Diciembre 2017”

Este documento de Consentimiento Informado tiene dos partes:

1. Hoja de información para los participantes (proporciona información sobre el estudio).
2. Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo a participar).

### PARTE I. INFORMACIÓN PARA LOS PARTICIPANTES

**Introducción.** Nosotros, Denis Rolando Serquén Alarcón y Bila Marina Terrones Hernández, Bachilleres en Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, estamos investigando sobre la Prevalencia de *Leptospira spp.* en trabajadores de camales. Le vamos a dar información e invitarle a participar de esta investigación. No tiene que decir hoy si participará o no; antes de decidirse, puede hablar con alguien y sentirse cómodo(a). Puede que haya palabras que no entienda. Por favor nos interrumpe en cualquier momento para despejar sus dudas. Si más tarde tiene preguntas, puede volver a mí o a los miembros del equipo de investigación.

**Propósito.** La Leptospirosis es una zoonosis reemergente endémica distribuida a nivel mundial. La presencia de esta enfermedad no solo implica problemas a nivel epidemiológico sino también de tipo económico y social. Se consideran grupos de riesgos al personal que trabaja con animales o sus productos y a los que laboran en un medio ambiente contaminado como: ganaderos, médicos veterinarios, trabajadores de mataderos, procesadores de pescado y de aves, trabajadores agrícolas, especialmente los cañeros y de los arrozales, los que laboran en las canteras, mineros, constructores, trabajadores del alcantarillado y de las pisciculturas, servicios comunales, los militares en campaña y las movilizaciones agrícolas. Esta circunstancia plantea la necesidad de detectar la presencia de *Leptospira spp.* en muestras de orina, esto constituye la razón de nuestro estudio.

**Tipo de Intervención.** Ésta investigación incluirá la recolección de una muestra de orina en una única vez.

**Procedimientos y protocolo.** Si usted acepta participar en este estudio de investigación, se realizarán los siguientes pasos:

1. Se solicitará la muestra de orina.
2. Se realizará el estudio y análisis de la muestra a nivel molecular.
3. Los resultados correspondientes se les entregará de manera personal en un sobre sellado.

**Riesgos.** No se prevén riesgos por participar en este estudio de investigación.

**Beneficios.** Si usted participa en esta investigación, tendrá la posibilidad de descartar la presencia de esta enfermedad, y con ello la oportunidad de tratarse. Puede que no haya mayor beneficio para



Usted que, el expuesto anteriormente, pero es probable que su participación nos ayude a encontrar respuesta a la pregunta de investigación.

**Incentivos.** La investigación no ha considerado ningún incentivo económico si decide participar. No obstante, se le ofrece la realización de los análisis especiales gratuitos.

**Confidencialidad.** Nosotros no compartiremos la identidad de aquellos que participen en la investigación, asimismo, la información que obtendremos será confidencial y solo los investigadores tendremos acceso a ella. Cualquier información acerca de Usted tendrá un número en vez de su nombre. Solo los investigadores sabrán cuál es su número y se mantendrá la información bajo llave.

**Compartiendo los resultados.** El conocimiento que obtendremos por realizar esta investigación se compartirá con Usted antes que se haga disponible al público. No se compartirá información confidencial. Después, se publicarán estos resultados para que otras personas puedan aprender nuestra investigación.

**Derecho a negarse o retirarse.** Usted no tiene por qué participar en esta investigación si no desea hacerlo, también puede dejarlo en cualquier momento; y al negarse o dejar de participar no le afectará en ninguna forma.

**A quién contactar.** Si tiene cualquier pregunta puede hacerlas ahora o más tarde. Incluso después de haberse iniciado el estudio. Si desea realizar preguntas más tarde, puede contactar a cuales quiera de las siguientes personas: **Denis Rolando Serquén Alarcón.** Teléfono: 978526729; **Marina Terrones Hernández.** Teléfono: 938558752.

## PARTE II. FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO

Acepto voluntariamente participar en este estudio, comprendo que cosas me van a pasar si participo en el proyecto, también entiendo que puedo decidir no participar y que puedo retirarme del estudio en cualquier momento.

Nombre del participante: .....

DNI del participante: ..... Fecha: ...../...../ 201.....

Firma del participante: .....

*Investigador responsable:*

Nombre: .....

DNI: ..... Fecha: ...../...../ 201.....

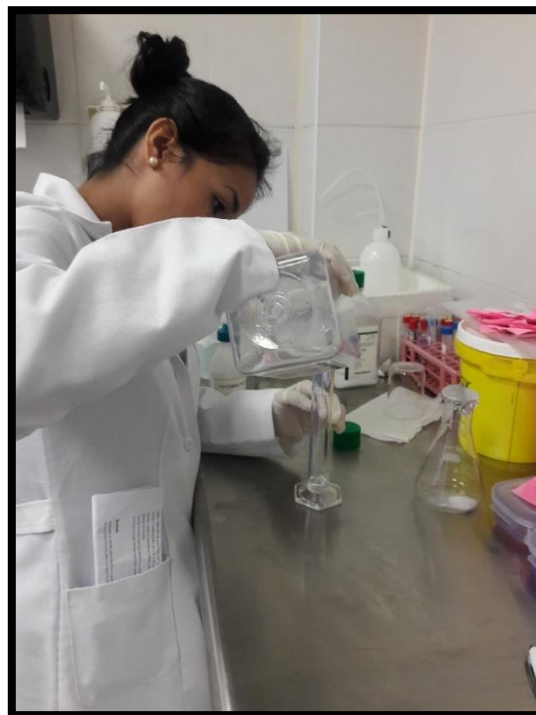
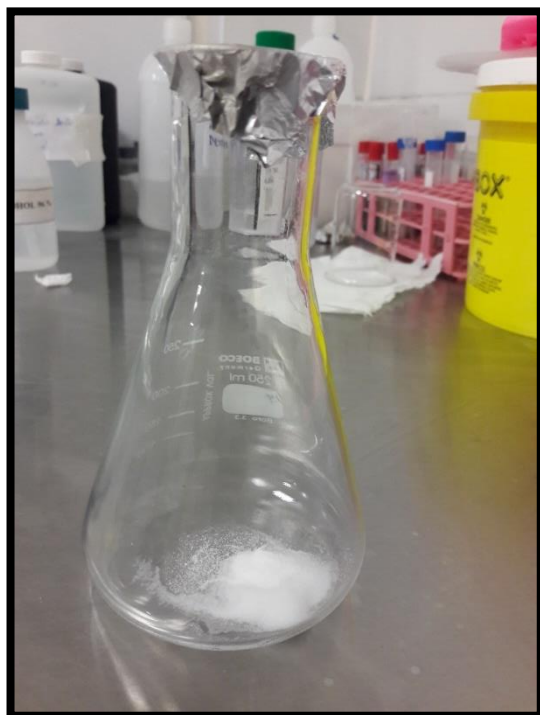
Ha sido proporcionada al participante una copia de este documento de consentimiento informado.



### ANEXO 3. FOTOS

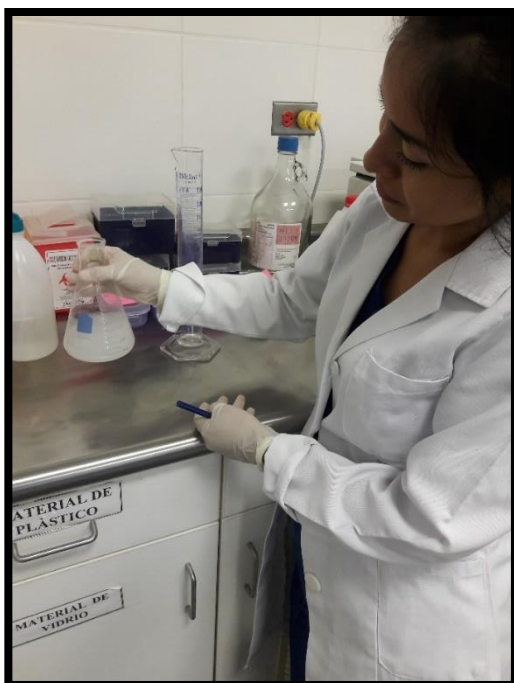


**Preparación del Master Mix**





**Agarosa al 2%**



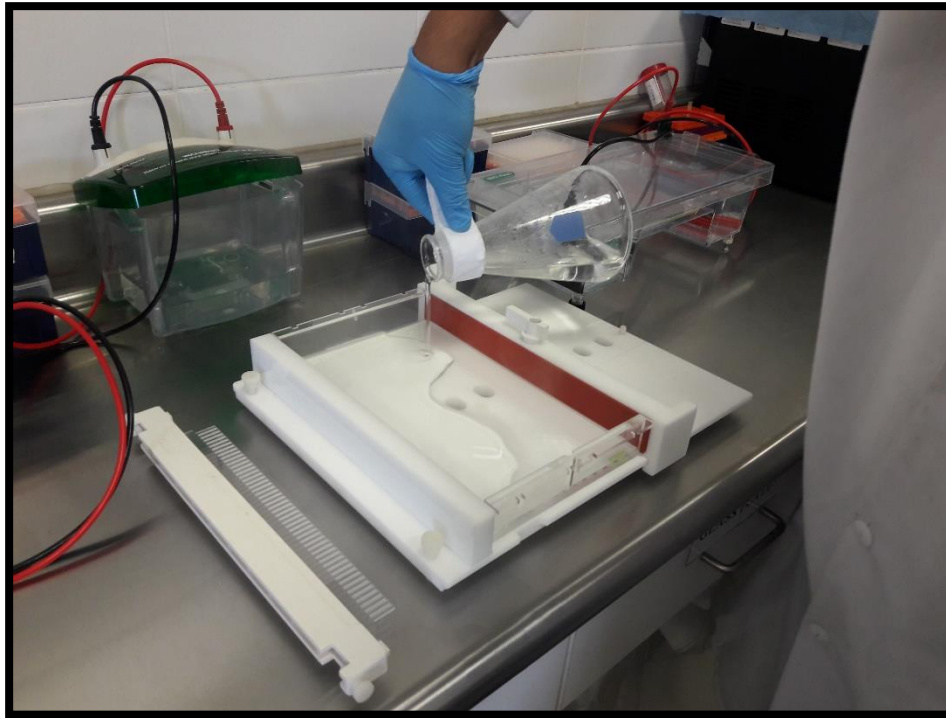
**Buffer TBE 1X**



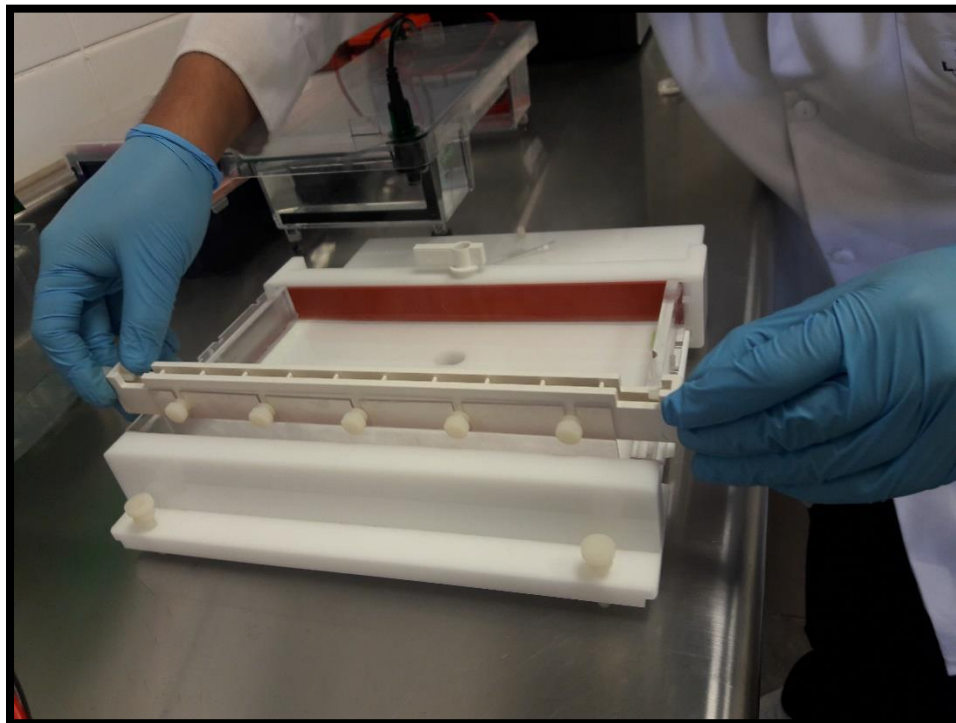
**Preparación del Gel de Agarosa al 2%**



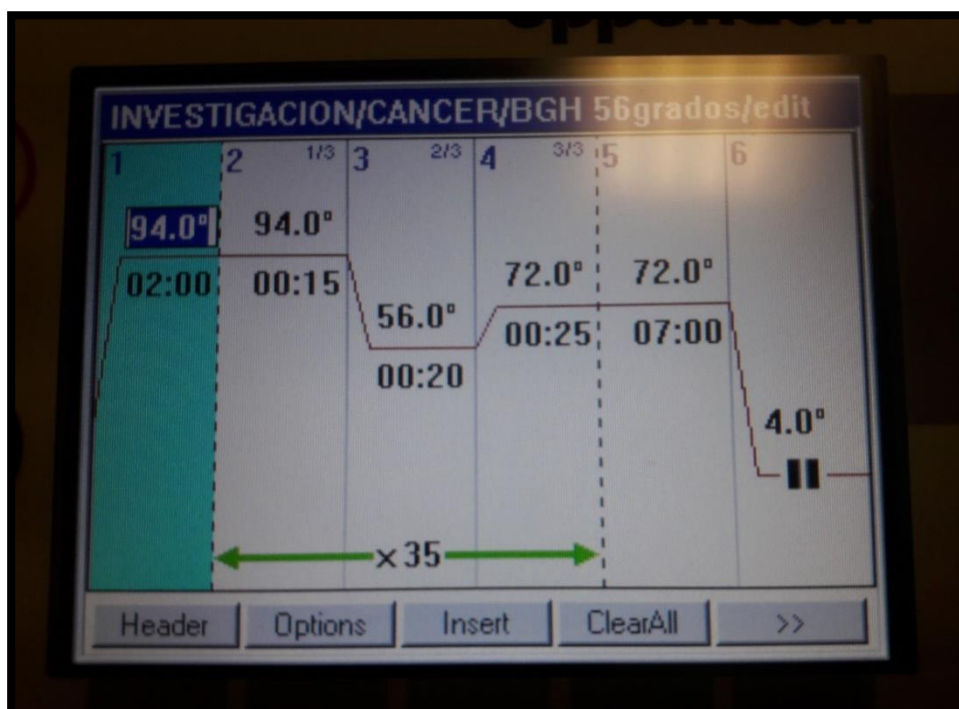
**Agarosa al 2%**



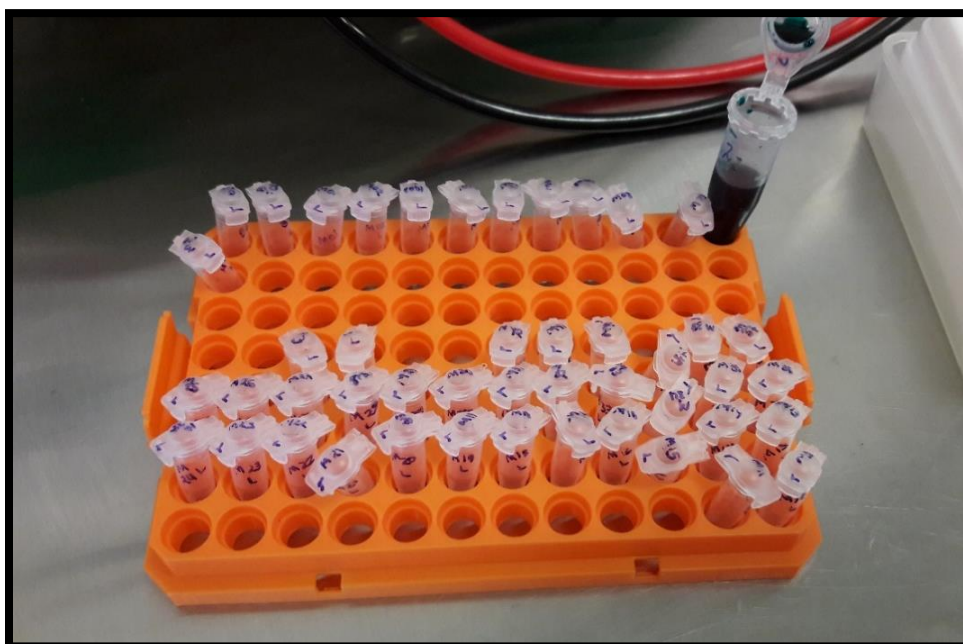
**Molde de Gel para Electroforesis**



**Peine de 50 posillos para Gel de Agarosa**

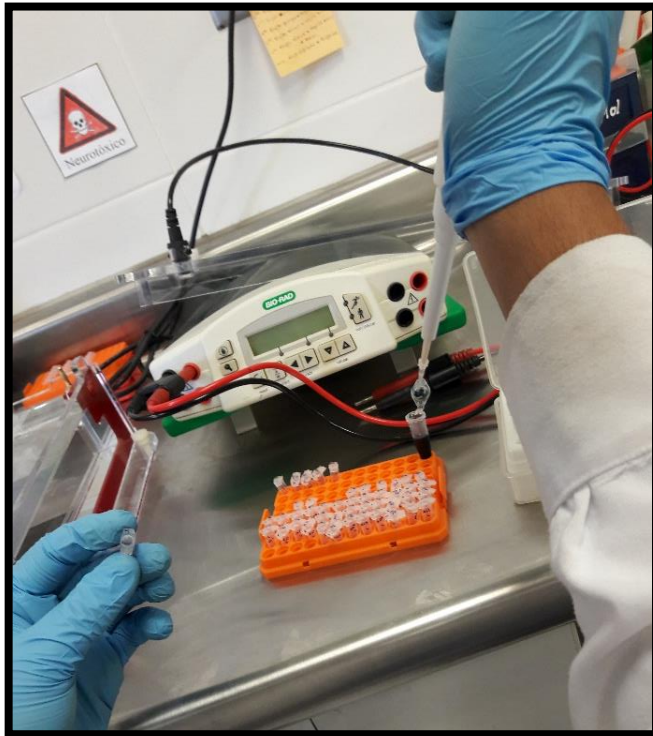


**Amplificación de L3 y L4 a 56°**

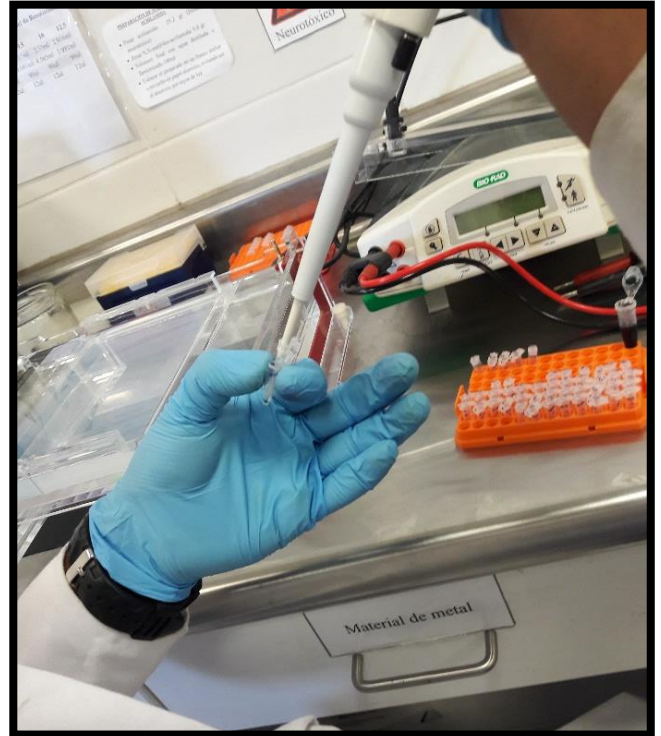


**Muestras amplificadas listas para Electroforesis**

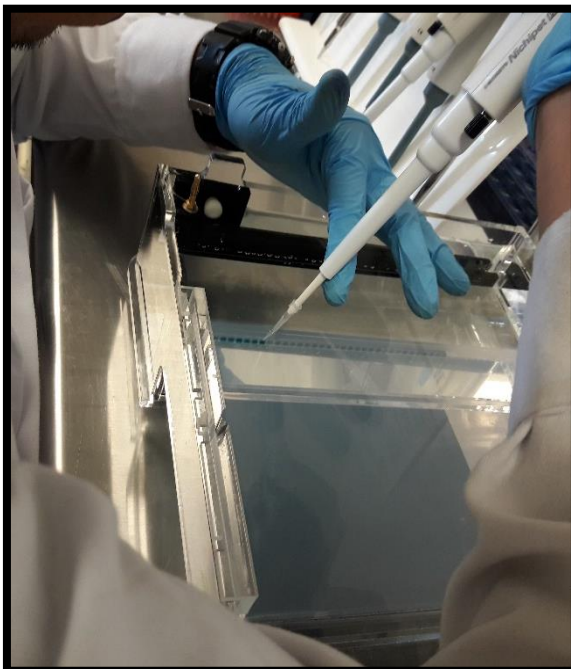




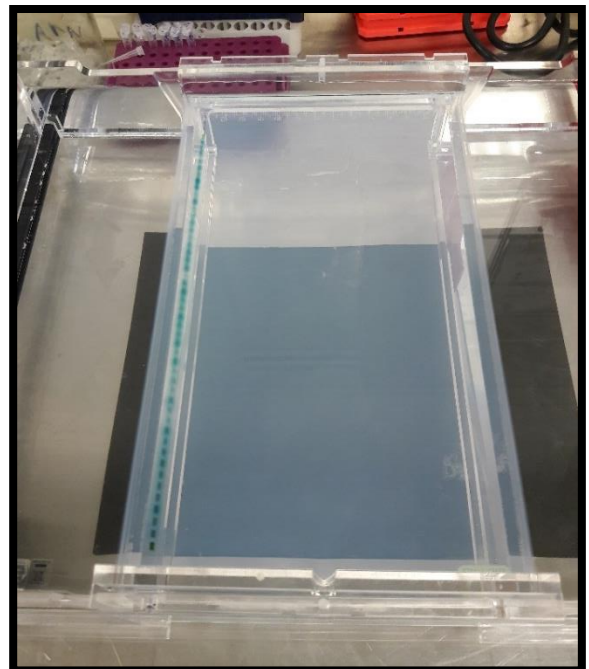
**Buffer de corrida 2X**



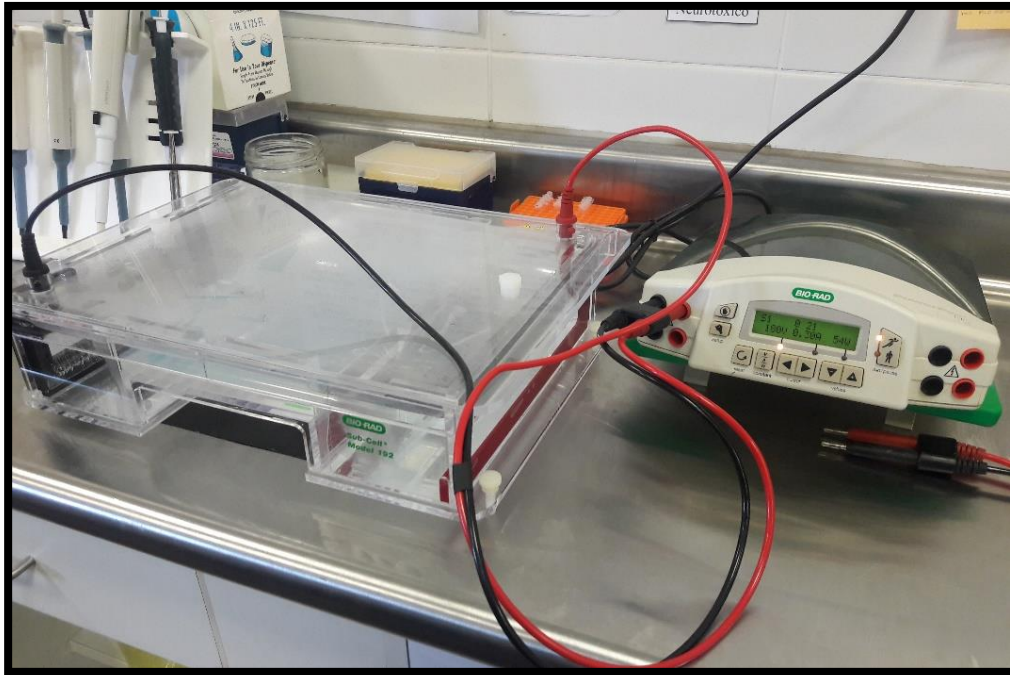
**Homogeneización de Mx y Buffer 2X**



**Siembra de Muestra en posillos**



**Siembra total de las muestras en gel**



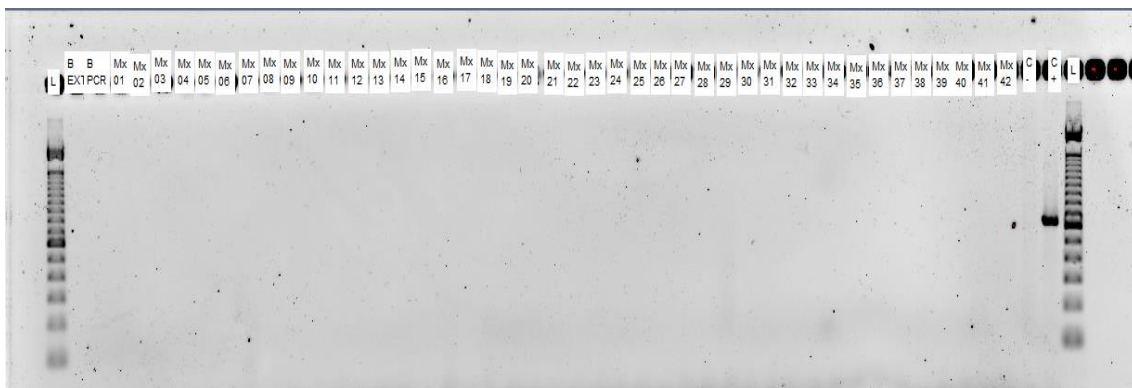
**Corrida Electroforética**



**Tinción del gel con Bromuro de Etidio**

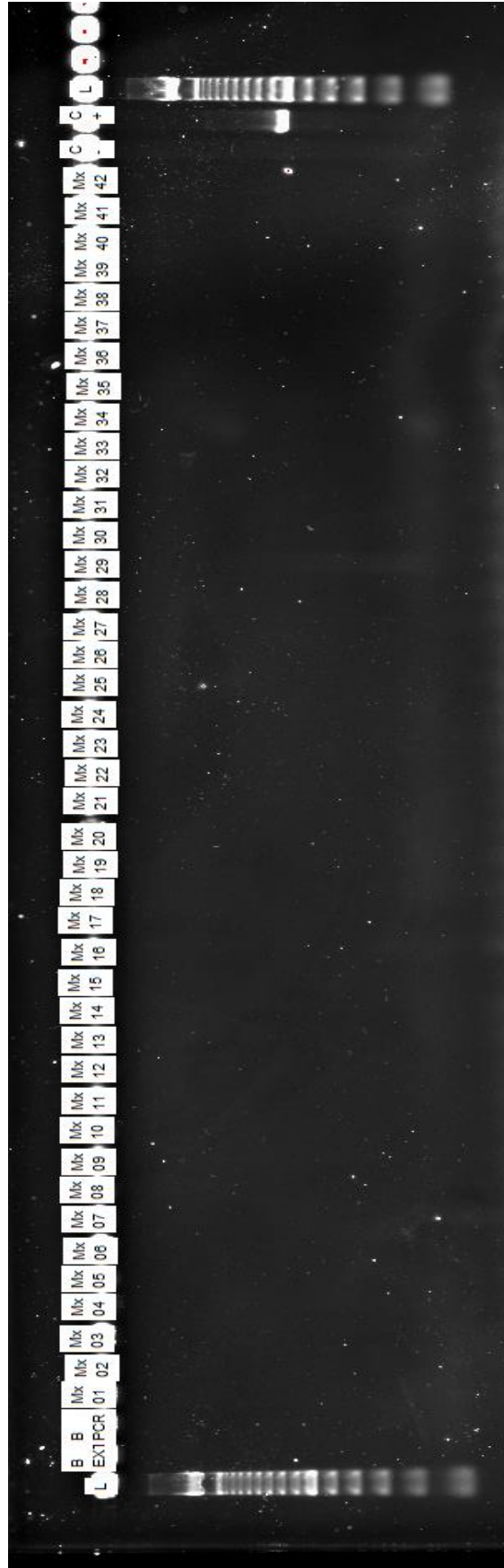


**Pharos Fx Plus – BioRad**



**Electroforesis en gel de Agarosa al 2% para estudio de sensibilidad de *Leptospira spp.***





*Electroforesis de Gel de Agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio para estudio de sensibilidad de Leptospira spp.*  
*C1: Marcador de Peso Molecular (pb); C2: Blanco de extracción; C3: Blanco de PCR; C4 – C45: Muestras de trabajadores;*  
*C46: Control Negativo (C-); C47: Control Positivo de Leptospira (660 pb); C48: Marcador de Peso Molecular (pb).*



**Laboratorio Biología Molecular – Hospital Regional Lambayeque**