

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Identificación de especies de *Leptospira* en riñones de cerdo

Nicole Doménica Hinojosa Viteri

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 17 de diciembre de 2021

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

Identificación de especies de *Leptospira* en riñones de cerdo

Nicole Doménica Hinojosa Viteri

Nombre del profesor, Título académico

Verónica Barragán, Ph.D

Quito, 17 de diciembre de 2021

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Nicole Doménica Hinojosa Viteri

Código: 200728

Cédula de identidad: 1720720976

Lugar y fecha: Quito, 17 de diciembre de 2021

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial que afecta a múltiples especies de animales y al humano. Actualmente poco se sabe sobre el efecto de esta enfermedad en cerdos del Ecuador, sin embargo, estudios realizados en otros países reportan que la leptospirosis causa problemas reproductivos en el ganado porcino por lo que, de no ser controlada, puede tener un impacto económico en el área agropecuaria. En Ecuador existen granjas de traspatios, especialmente en las regiones costeras, las cuales carecen de condiciones sanitarias adecuadas y control veterinario. El objetivo de este trabajo es identificar las especies de *Leptospira* que se encuentran causando enfermedad en cerdos de traspatio faenados en el camal de Portoviejo-Manabí. Para esto se identificaron las especies de *Leptospira* presentes en 40 muestras previamente identificadas como positivas y provenientes de cerdos con lesiones histopatológicas en sus riñones. La identificación de especies de *Leptospira* fue realizada mediante la secuenciación del gen *SecY*. Los resultados de este trabajo muestran a *L.interrogans* y *L.santarosai* como las dos especies responsables de leptospirosis en los cerdos de traspatio analizados. *L.interrogans* ha sido previamente reportada en cerdos y en roedores, mientras que *L.santarosai* está en el ganado bovino y en ciertos animales domésticos, aunque en países como Perú y México ha sido encontrada en orina de cerdos. Este estudio brinda un panorama más amplio sobre lo que está sucediendo actualmente en las granjas de traspatio en Manabí y permite comprender sobre las especies que están produciendo enfermedad en cerdos a nivel local.

Palabras clave: *Leptospira*, Leptospirosis, Cerdos, Traspatio, Manabí

ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonotic disease of worldwide distribution that affects multiple species of animals and humans. Currently little is known in Ecuador about the effect of this disease in swine, however, studies carried out in other countries report that leptospirosis causes reproductive problems in pigs, therefore, if it is not controlled, it may have an economic impact on animal production. In Ecuador there are backyard farms, especially in coastal regions, which lack sanitary conditions and veterinary control. The aim of this work is to identify *Leptospira* species that are causing disease in pigs from these farms, slaughtered in the Portoviejo-Manabí slaughterhouse. During this work, *Leptospira* species were identified in 40 samples previously identified as positive from pigs with histopathological lesions in their kidneys. The identification of *Leptospira* species was carried out by sequencing the *SecY* gene. The results of this work showed *L. interrogans* and *L. santarosai* as two species responsible for leptospirosis in the analyzed backyard pigs. *L. interrogans* has previously been reported in pigs and rodents, while *L. santarosai* is found in cattle and certain domestic animals, although in countries such as Peru and Mexico it has been found in pig urine. This study provides a broader picture of what is currently happening in backyard farms in Manabí and allows us to understand the species that are causing disease in pigs at a local level.

Key words: *Leptospira*, Leptospirosis, Pigs, Backyard, Manabí

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUCCIÓN | 10 |
| 2 MATERIALES Y MÉTODOS | 14 |
| 2.1 Muestras de cerdos seleccionadas:..... | 14 |
| 2.2 Identificación de especies de <i>Leptospira</i> : | 14 |
| 2.3 Identificación de especies mediante el secuenciamiento del gen <i>SecY</i> a través de Oxford Nanopore: | 14 |
| 2.4 Análisis de secuencias: | 15 |
| 3 RESULTADOS..... | 16 |
| 4 DISCUSIÓN | 17 |
| 5 CONCLUSIONES | 20 |
| 6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 25 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Información sobre las muestras e identificación de especies en el Genbank en base al porcentaje de similitud..... | 21 |
|--|----|

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Identificación de especies de <i>Leptospira</i> con la similitud de las secuencias del gen <i>SecY</i> del GenBank..... | 22 |
| Figura 2. Identificación de especies de <i>Leptospira</i> de las muestras a través de un árbol filogenético utilizando secuencias de leptospiros patógenas del GenBank. | 23 |

1 INTRODUCCIÓN

La *Leptospira* es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia *Leptospiraceae*, orden Spirochaetales. Actualmente existen dos tipos de clasificación para la *Leptospira*. El primero incluye a los serogrupos, mientras que el segundo utiliza la taxonomía molecular para definir especies y genotipos. Filogenéticamente el género posee 64 especies que se dividen en dos grupos basándose en su patogenicidad: patógenas y no patógenas (Vincent, et al., 2019).

Esta bacteria, es el agente etiológico de la leptospirosis, una enfermedad que presenta una distribución mundial, llegando a tener un impacto no solo en la salud humana y animal, sino que también repercute en la economía del sector pecuario de los países que lo padecen (Burgos Macías, et al., 2019). Se la conoce como la enfermedad de Weil o fiebre interhemorrágica, así como otros nombres correspondientes a las diferentes sintomatologías descritas en personas infectadas. La leptospirosis es una enfermedad zoonótica, es decir que es transmisible de animal a humano, infectando mayormente a mamíferos domésticos, fauna silvestre y humanos. Los roedores son el principal reservorio, provocando infecciones en animales domésticos (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010). La infección puede ser ya sea por orina de un hospedero infectado o agua contaminada al entrar en contacto con mucosas y por medio de abrasiones cutáneas (Levett & Edwards, 2009). Otra forma poco abordada de contagio es mediante las técnicas de reproducción asistida (Bielanski & Surujballi, 1998).

Esta bacteria llega a colonizar diferentes órganos, siendo el riñón el órgano diana de la infección, ya que es la clave del ciclo biológico de la *Leptospira* debido a que se excreta por medio de la orina, para así infectar a otros animales (Aguarón & Farré, 2015). La epidemiología de la leptospirosis se ve influenciada por factores como el clima, el comportamiento antropomórfico y la cría de animales. De esta manera, toda actividad que implique el contacto

con órganos infectados, orina, agua y suelo contaminado, es considerada como factor de riesgo (Burgos Macías, et al., 2019).

En general, los animales que son reservorio de *Leptospira* son asintomáticos, presentando una leve infección en los túbulos renales, lo cual permite que la transmisión sea prolongada. Sin embargo, pueden llegar a presentar múltiples daños en los tejidos, principalmente en el renal (Babudieri, 1958). Dentro de las patologías que afectan al riñón las que prevalecen son la nefritis intersticial aguda, glomerulonefritis, necrosis tubular aguda, hiperemia, entre otros (Zimmerman, et al., 2019). Todas estas afectaciones se dan por la presencia de antígenos de *Leptospira* en el tejido renal lo que conducen a una disfunción tubular e inflamación (Daher, et al., 2010). En el caso de la nefritis intersticial aguda, las leptospiras patógenas se acumulan en los túbulos proximales, lo que causa una lesión tubular (Yang, et al., 2002). La glomerulonefritis en cambio es producida por la inflamación de los glomérulos por la activación del sistema inmune al detectar antígenos de *Leptospira* circulantes (Zimmerman, et al., 2019). Estas nefropatologías también pueden darse por otros microorganismos o por enfermedades autoinmunes, lo que hace complicado el diagnóstico de leptospirosis basándose únicamente en los signos que presenta el animal. Para la detección de leptospiras patógenas se utiliza principalmente serología, pero también se emplean métodos moleculares como la qPCR. Generalmente se utiliza la detección del gen *LipL32* en muestras de orina, fluido vaginal, y biopsias de riñón. Este gen codifica para un lipopolisacárido presente en la membrana externa de las especies patógenas (Stoddard, et al, 2009). Otro ensayo utilizado para la detección del patógeno es el SNP111, marcador molecular ubicado en el gen *16s rRNA* permitiendo la identificación de especies patógenas de *Leptospira* (Barragan, et al., 2016).

Para genotipar a la *Leptospira* se suele utilizar MLST (Multi-locus Sequence Typing), en donde se emplean genes de mantenimiento conservados. Los genes analizados generalmente están divididos en dos esquemas. El primero incluye los genes *icdA*, *adk*, *rrs2*, *secY*, *LipL41* y

LipI32 (Ahmed, et al., 2006), mientras que el segundo incluye a: *fadD*, *pfkB*, *sucA*, *mreA*, *tpiA*, *glmU* y *pntA* (Thaipadungpanit, et al., 2007). La información que se obtiene a partir de la secuencia de estos genes permite analizar la variación alélica y por tanto la tipificación del patógeno (Enright & Spratt, 1999).

En Ecuador, la leptospirosis no ha sido muy abordada y es uno de los países con mayor incidencia de esta enfermedad (Pappas, et al, 2008). Mediante datos clínicos y serológicos se ha logrado determinar que la provincia de Manabí es el principal foco endémico de leptospirosis (Pinargote, 2012). Se han realizado diferentes estudios en zonas costeras del país para determinar la prevalencia de la leptospirosis en cerdos de la provincia de Manabí. En las parroquias Río Chico y Calderón del Cantón Portoviejo, se identificaron 3 especies que predominan en cerdos: *L. borgpetersenii*, *L. wolffii* y *L. interrogans* (Guerrero & Villavicencio, 2019). Mientras que, en un estudio realizado en mataderos locales de la provincia de Manabí, en el cantón Santa Ana y la parroquia de Calderón se lograron identificar 6 especies: *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. kirschnerii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. wolffii* y *L. licerasiae* (Barragan, et al., 2016).

La mayoría de cerdos de la provincia de Manabí son criados en granjas poco tecnificadas y en el traspatio de las viviendas. La crianza de traspatio es un término utilizado para animales con fines de autoconsumo, que también son utilizados para la venta de sus productos, ya sean derivados o carnes, a través de diferentes intermediarios en mercados de las distintas localidades rurales (Martínez, et. al., 2016). La porcicultura de traspatio hace referencia a la crianza de cerdos con fines de autoconsumo o venta de localidad. Estos animales son criados de manera rustica donde se mantienen estándares de baja calidad, por lo que es común observar comedores, bebedores y corrales insalubres, donde existen aguas estancadas o empantanadas cerca del animal, generando ambientes contaminados no aptos para la crianza (Nario, 2017). En estas condiciones, la transmisión de leptospirosis es altamente probable y

representa un mayor problema cuando los animales se encuentran expuestos a áreas lodosas o aguas estancadas que son favorecidas por el medioambiente (Cassanovas, et. al., 2018). El foco de la contaminación se ve localizada en zonas agrícolas, o en actividades donde existe contacto animal o productos derivados de este ya que el contacto con material orgánico de animales contaminados es mucho mayor. De igual forma, aguas estancadas, fangos o criaderos insalubres aumentan la probabilidad de una infección.

La estrategia que el sector pecuario utiliza para prevenir la leptospirosis en cerdos del Ecuador es la vacunación. Existe una vacuna contra la leptospirosis denominada Porcilis® Ery+Parvo+Lepto, esta vacuna es octavalente y protege principalmente al cerdo contra la Erisipelas, el Parvovirus y la leptospirosis, enfermedades que causan pérdidas y problemas reproductivos. Sin embargo, es importante mencionar que esta vacuna solo sirve para algunas serovariedades de *L. interrogans* (Jacobs, et al, 2015). Adicionalmente, en el Ecuador, la única vacuna obligatoria para los cerdos es la de la peste porcina clásica, más no para la leptospirosis, aunque si existe un programa de vacunación que incluye a verracos, madres, chanchillas y cerdos de engorde (AGROCALIDAD, 2020). Por esta razón, es de importancia abordar cuáles son los factores de riesgo que se encuentran involucrados en la transmisibilidad de la enfermedad en condiciones de traspatio y darle un enfoque a la prevención y monitoreo en las zonas más susceptibles del país (Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2021). Dado que la provincia de Manabí es una región ganadera con una alta producción y crianza de cerdos domésticos (granjas y traspacios), esta enfermedad podría tener impacto en el ámbito económico de la zona y ser un factor importante de riesgo de transmisión a humanos (Guerrero & Villavicencio, 2019), en donde los síntomas son muy amplios, llegando a tener infecciones multiorgánicas (Delmas, et al., 2018). Por lo tanto, el objetivo de este proyecto es identificar las especies de *Leptospira* que están causando enfermedad en los cerdos de traspatio y llegar a comprender un poco más sobre los mecanismos de infección en estos criaderos en Manabí.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Muestras de cerdos seleccionadas:

Las 40 muestras de riñón de cerdo utilizadas fueron recolectadas en el período 2018-2019, previamente analizadas mediante qPCR para los genes *Lipl32* y *SNP111* obteniendo resultados positivos para *Leptospira*. Dichas muestras conservadas en tubos con alcohol al 80% en congelación para evitar la degradación del ADN. Todas las muestras presentaban nefropatologías sugestivas de leptospirosis identificadas a nivel microscópico por el doctor Carlos Bulnes y la doctora Patricia Zambrano.

2.2 Identificación de especies de *Leptospira*:

Para la identificación de especies presentes en las muestras de riñón de cerdo analizadas se empleó el gen *SecY* (Ahmed, et al., 2006). Este gen codifica para la translocasa preproteica bacteriana el cuál es parte del muy conservado operón S10-spc- α (Cosate, et al, 2012). Para la amplificación se empleó el máster mix con la enzima Q5 de alta fidelidad de BioLabs (New England, BioLabs), una concentración 0,4 μ M de primers y 1 μ L de ADN con un volumen final de reacción de 12,5 μ L. Se usó el par de primers *secYR* y *secYF* que amplifican un fragmento de 549 pb (Ahmed, et al., 2006). Las condiciones de termociclado aplicadas fueron 98 °C por 30 segundos seguido de 35 ciclos de 98 °C por 10 segundos, 58 °C por 30 segundos, 72 °C por 15 segundos. Por último 72 °C por 2 minutos y una temperatura de hold de 10 °C.

2.3 Identificación de especies mediante el secuenciamiento del gen *SecY* a través de Oxford Nanopore:

Los amplicones obtenidos se purificaron con el kit AMPure (Beckman Coulter, USA). Posterior a esto se cuantificó el ADN mediante el uso de Qubit™ 1X dsDNA (Thermo Scientific, Invitrogen, USA). Para la normalización se intentó llegar a las 200fmol por amplicón. Para la preparación de la librería Oxford Nanopore se utilizó el protocolo del kit de

Ligation (Oxford Nanopore Technologies, UK) y a cada amplicon se le asignó un barcode distinto. Una vez ya lista la librería, se cargó 22,92 ng en una celda de flujo MinION (FLO-MIN 106) y se dejó correr el software durante aproximadamente 12 horas. Se realizó el basecalling de las reads con la ayuda del software Guppy (versión 3.4.5) (Oxford Nanopore Technologies, UK). Estas reads fueron demultiplexadas con Porechop (versión 0.2.4) (<https://github.com/rrwick/Porechop>).

2.4 Análisis de secuencias:

Todas las “reads” obtenidas por cada barcode se alinearon con el genoma de referencia de *L. interrogans* serovar Copenhageni FioCruz L1-130 cromosoma 1 (NC_005823.1) utilizando el software minimap2 (versión 2.22) (Li, 2021). Posteriormente, con el software Tablet (versión 1.21.02.08) se mapearon las reads y se escogieron las pertenecientes al gen *SecY*. Luego, cada read perteneciente a cada barcode se alineó utilizando el software MEGA-X (versión 10.1.8) (Kumar, et al., 2018). Seguido a esto, con la herramienta EMBOSS (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/emboss_cons/), se obtuvo las secuencias consenso. A estas secuencias consenso se les realizó un BLASTn (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) para definir la especie, asumiendo un porcentaje de similitud mayor al 90% como bueno. Se construyó un árbol filogenético utilizando MEGA-X (versión 10.1.8) utilizando Maximum Likelihood Test (MLT) (Guindon & Gascuel, 2003) con 500 bootstraps y el método Tamura-Nei (Balboni, et al, 2020).

3 RESULTADOS

Se encontró secuencias del gen *SecY* de *Leptospira* en 31 de las 40 muestras analizadas. Por otro lado, en el 22.5% de las muestras no se obtuvo información, tal como se observa en el Figura 1. De las 31 muestras se obtuvo información sobre el tamaño de la secuencia obtenida el cual es similar al tamaño esperado de la secuencia *SecY* que comprende 549 pb (Ahmed, et al., 2006), tal como se observa en la Tabla 1. Además se obtuvo el porcentaje de similitud entre nuestras secuencias obtenidas y las secuencias de leptospirosis patógena reportadas en el GenBank. En la Tabla 1. se observa la especie representativa de *Leptospira* de las muestras en base a las secuencias del GenBank con mayor similitud. De las muestras que si se obtuvo información, 29 pudieron ser identificadas hasta nivel de especie, obteniendo 2 especies de *Leptospira*. El 55% del total las muestras presentó una alta similitud con la especie *Leptospira interrogans*, mientras que el 17.5% de las muestras mostró similitud con *Leptospira santarosai*, como se encuentra representado en la Figura 1. Por otro lado, 2 de las 31 muestras presentaron un porcentaje de similitud menor al 89%. Dichas muestras representan el 5% del total y son las P043 y P042, por ende se las dejó como *Leptospira spp.*

En cuanto a la agrupación de las especies patógenas de *Leptospira* mediante el árbol filogenético (Figura 2.), se obtuvieron resultados similares a los reportados en la Tabla 1. y Figura 1. Todas las 29 secuencias de las muestras se agruparon tanto con *Leptospira interrogans* como con *Leptospira santarosai*. A diferencia de la tabla, el árbol si agrupó a las muestras P043 y P042 con estas especies. P043 se agrupó con *Leptospira interrogans* y P042 se agrupó con *Leptospira santarosai*. El valor bootstrap para la agrupación de *Leptospira interrogans* es de 98 y para *Leptospira santarosai* fue de 84.

4 DISCUSIÓN

Las granjas y traspatios de cerdos han sido blancos susceptibles para el desarrollo la leptospirosis. Se conoce que para el desarrollo de esta enfermedad de preocupación se necesitan de condiciones idóneas. Este problema abarca a los seres humanos, animales de granja y el ambiente que los rodea. El estado actual de la leptospirosis en granjas de traspatios en Ecuador es poco conocido, datos publicados en el 2016 muestran que el porcentaje de positividad de la infección es de 21.1% en cerdos de sectores rurales del matadero municipal en Manabí (Barragan, et al, 2016). Las provincias costeras son aquellas zonas que presentan una mayor prevalencia, específicamente Manabí-Portoviejo según los datos oficiales del Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación del Ecuador (INSPI). Además Ecuador se encuentra en el puesto numero 18 dentro de los países que presentan una incidencia alta de leptospirosis (Pappas et al, 2008), registrando un alto número en Guayaquil en los años 1919 hasta el 2003.

En cerdos se conoce que las especies de importancia abarcan específicamente a *L. interrogans* y *L. borgpetersenii*. A partir de estas especies se conocen varios serotipos de preocupación. Para el caso de *L. interrogans* se conocen los siguientes serotipos: canicola, pomona, bratislava y icterohaemorrhagiae. En el caso de *L. borgpetersenii* los serotipos son serjoe y tarassovi. Los serovares pertenecientes a *L. interrogans* son aquellos que más se han adaptado, en especial el serovar pomona, al huésped natural que es el cerdo (Anampa et al, 2012). A pesar de que los demás serovares presentan un huésped natural como canidos y grandes ruminantes han llegado a ser capaces de causar leptospirosis en cerdos, probablemente por eventos de interacción entre reservorios de estos patógenos dentro de granjas y traspatios, pues para llegar a una infección por *Leptospira*, es necesario del contacto directo con este patógeno en una cantidad infectiva suficiente (Ko, et al, 2009).

Cuando el cerdo infectado comienza a presentar síntomas como fiebre, inapetencia, abortos, ictericia, sangre en orina, palidez, hemorragia, entre otros, se debe diagnosticar inmediatamente mediante muestras de sangre, revisión de vacunas, PCR para orina y fetos que fueron abortados. Las principales patologías que llegan a presentar estos animales de granja son principalmente nefritis intersticial multifocal, conjuntiva ocular con ictericia, fetos momificados y canales con ictericia. En casos más graves ocurre la muerte súbita del animal debido a varios factores como daño hepatocelular.

Se sabe que esta bacteria tiene una predilección por los riñones, por esta razón la enfermedad más notoria es la nefritis intersticial, caracterizada por presentar varios puntos blanquecinos en la corteza de la medula (Ochoa & Bouda, 2007). Además, los riñones pueden llegar a reducirse en un factor de 1.5 veces con respecto a su tamaño normal. Al realizar un examen microscópico también se puede diferenciar una nefritis tubulointersticial, la cual muestra nódulos linfáticos renales. Estos nódulos presentan un tamaño más grande con respecto al normal, este tamaño puede ser 10 veces mas grande que el original (Daher et al, 2010). Una vez sacrificados se ha observado de forma microscópica vasculitis necrotizante sistémica acompañada de glomerulonefritis necrosante. En varios casos los riñones pueden presentar una apariencia normal, pero se recomienda analizar los ganglios linfáticos renales ya que estos pueden estar agrandados tal como se mencionó anteriormente (Hurtado & Pérez, 2018).

Debido a lo mencionado anteriormente se ha concentrado la atención en *L. interrogans* y sus serovares, tomando en cuenta específicamente los reservorios los cuales tienen una relación comensal con la bacteria, esto incluye a mamíferos pequeños que transmiten la enfermedad a animales domésticos, de granja y humanos. Aquellos que son afectados son generalmente ovinos, vacunos y canidos, resaltando entre ellos el serovar Pomona (Carpenter et al, 2006). Los vacunos presentan una clara mastitis tras la infección y aborto prematuro.

Dado a que estos animales, incluido el cerdo, se encuentran en contacto constante debido a prácticas profesionales, es común que se den infecciones hacia los humanos, especialmente a granjeros, veterinarios y grupo de control de roedores. Incluso se ha confirmado que pescadores pueden llegar a contagiarse debido al contacto con orina de ratas infectadas (Céspedes, 2005).

L. santarosai de igual forma puede causar leptospirosis bovina mediante el serovar Tarassovi, este es bastante común en América Latina y Centro América. Incluso se han llegado a encontrar búfalos infectados con esta especie, los cuales presentan un amplio tipo de serovares como Pyrogenes, Mini y Tarassovi (Agudelo et al, 2014). A pesar de no ser una especies reportada comunmente en cerdos, se ha encontrado a *L. santarosai* en orina de cerdos en Perú (Díaz Ortiz, 2019) y México (Cruz-Romero et al, 2018). También se ha diagnosticado a osos, marsupiales e incluso aves con esta especie, por lo que clasifica como especie de importancia ya que puede influir en el síndrome de Weil, afectando directamente al riñón (Carmona et al, 2011). Además se conoce que causa infecciones sistémicas por lo cual se han asociados varios genes con su virulencia gracias a la anotación del genoma de la misma. Con respecto a *L. interrogans* se ha observado que tiene un 8% de coincidencia con *L. santarosai* (Chou et al, 2012).

5 CONCLUSIONES

Para concluir, se encontró que tanto *L. interrogans* como *L. santarosai* se encuentran causando leptospirosis en los cerdos de las granjas de traspatios en Manabí, siendo *L. interrogans* la especie que se encontró en mayor proporción y *Leptospira santarosai* la especie poco común en menor proporción. Nuestros resultados indican que la leptospirosis es una enfermedad no controlada y descuidada en los cerdos de traspatios. Sería interesante, a futuro, realizar estudios en otras partes del país para entender sobre el estado actual de la leptospirosis en estas granjas de traspatios en otras provincias del Ecuador. Esto es de suma importancia, considerando que el Ecuador es un país ganadero y la prevalencia de esta enfermedad es relativamente alta.

TABLAS

Tabla 1. Información sobre las muestras e identificación de especies en el Genbank en base al porcentaje de similitud.

| Muestra | tamaño de secuencia SecY | % de similitud | Especie |
|----------------|---------------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| P051 | 544 | 97.9 | <i>Leptospira interrogans</i> |
| P092 | 547 | 93.04 | <i>Leptospira interrogans</i> |
| P082 | | | |
| P089 | 554 | 97.65 | <i>Leptospira santarosai</i> |
| P078 | 539 | 98.89 | <i>Leptospira interrogans</i> |
| P095 | 544 | 92.51 | <i>Leptospira santarosai</i> |
| P035 | 544 | 94.8 | <i>Leptospira interrogans</i> |
| P007 | 544 | 93.57 | <i>Leptospira interrogans</i> |
| P123 | 545 | 97.23 | <i>Leptospira interrogans</i> |
| P001 | | | |
| P043 | 500 | 88.82 | <i>Leptospira spp</i> |
| P006 | 546 | 99.45 | <i>Leptospira santarosai</i> |
| P011 | 542 | 98.28 | <i>Leptospira interrogans</i> |
| P042 | 540 | 84.35 | <i>Leptospira spp</i> |
| P024 | 547 | 99.82 | <i>Leptospira interrogans</i> |
| P015 | 538 | 96.28 | <i>Leptospira interrogans</i> |
| P185 | | | |
| P161 | 537 | 91.92 | <i>Leptospira interrogans</i> |
| P054 | 459 | 92.99 | <i>Leptospira interrogans</i> |
| P014 | 468 | 95.3 | <i>Leptospira santarosai</i> |
| P003 | 546 | 90.27 | <i>Leptospira santarosai</i> |
| P172 | 545 | 94.32 | <i>Leptospira interrogans</i> |
| P093 | 529 | 94.52 | <i>Leptospira interrogans</i> |
| P094 | | | |
| P088 | 549 | 94,8 | <i>Leptospira interrogans</i> |
| P046 | 524 | 94,64 | <i>Leptospira interrogans</i> |
| P009 | 544 | 97,95 | <i>Leptospira interrogans</i> |
| P047 | 546 | 96,42 | <i>Leptospira interrogans</i> |
| P0135 | | | |
| P056 | 544 | 95.35 | <i>Leptospira santarosai</i> |
| P144 | 535 | 92,41 | <i>Leptospira interrogans</i> |
| P022 | | | |
| P347 | | | |
| P355 | 549 | 94,17 | <i>Leptospira santarosai</i> |
| P132 | 538 | 95,17 | <i>Leptospira interrogans</i> |
| P002 | 532 | 95,63 | <i>Leptospira interrogans</i> |
| P018 | | | |
| P366 | 536 | 90,11 | <i>Leptospira interrogans</i> |
| P129 | 541 | 93,27 | <i>Leptospira interrogans</i> |
| P020 | | | |

FIGURAS

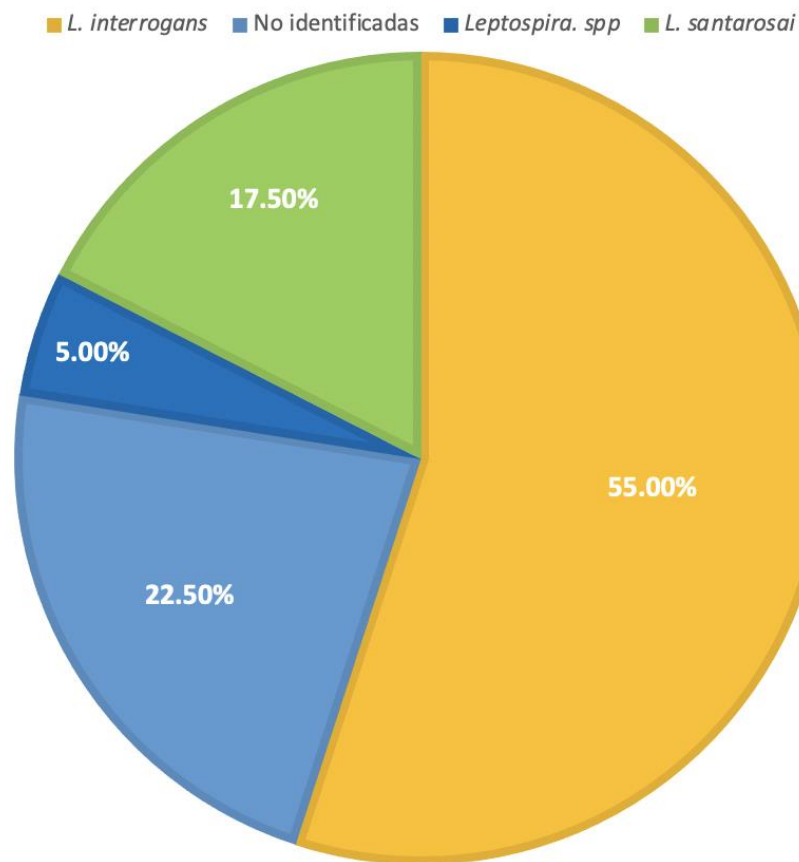


Figura 1. Identificación de especies de *Leptospira* con la similitud de las secuencias del gen *SecY* del GenBank.

***Leptospira interrogans* es la especie similar encontrada más abundante, representando el 55.00% de todas las muestras analizadas. Le sigue *Leptospira santarosai* con 17.50% y finalmente *Leptospira spp* con 5.00% de abundancia. El 22.50% restante pertenece al porcentaje de muestras no identificadas con secuencias del gen *SecY* de *Leptospira*.**

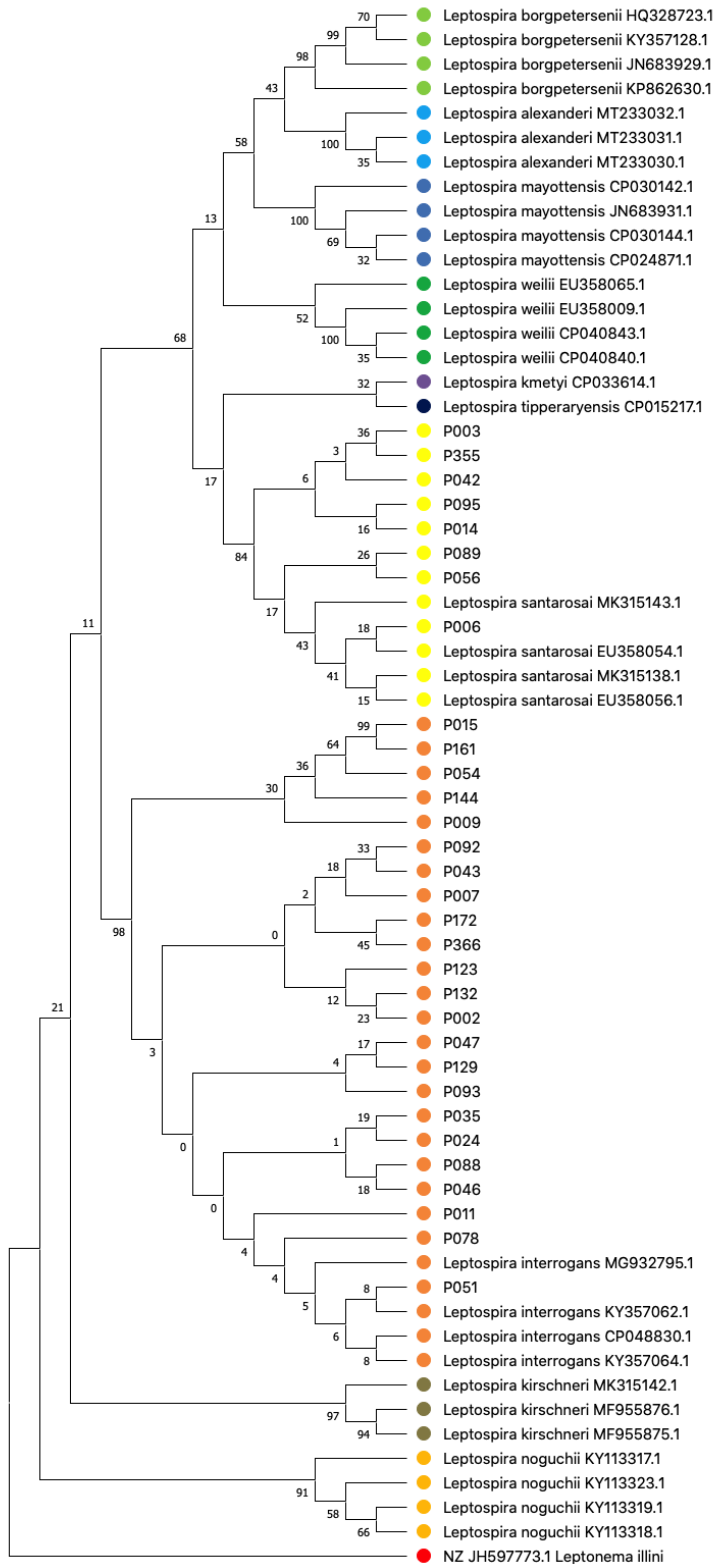


Figura 2. Identificación de especies de *Leptospira* de las muestras a través de un árbol filogenético utilizando secuencias de leptospiras patógenas del GenBank.

El árbol filogenético presenta la agrupación de distintas especies de *Leptospira* mediante secuencias del gen SecY. Las especies agrupadas con las muestras fueron *Leptospira*

santarosai en color amarillo y *Leptospira interrogans* en color anaranjado. En cada rama se encuentra el valor bootstrap obtenido. Para las muestras agrupadas con *Leptospira santarosai* el valor bootstrap fue de 84, mientras que para *Leptospira interrogans* fue de 98.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, B., & de la Peña Moctezuma, A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary microbiology*, 140(3-4), 287-296.
- AGROCALIDAD. (2020). Manual de Bioseguridad: Inocuidad de Alimentos. Recuperado el 8 de diciembre de 2021 de <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/man1.pdf>
- Aguarón, A., & Farré, C. (2015). Leptospirosis porcina. *Revista PorciNews*. Recuperado el 25 de noviembre de 2021 de <https://porcino.info/leptospirosis-porcina/>
- Agudelo-Flórez, P., Durango, H., Aranzazu, D., Rodas, J. D., & Travi, B. (2014). Genotipificación y evaluación de la dinámica de infección de un aislamiento colombiano de *Leptospira santarosai* en el modelo experimental en hámster. *Biomédica*, 34(3), 460-472.
- Ahmed, N., Devi, S. M., De los A Valverde, M., Vijayachari, P., Machang'u, R. S., Ellis, W. A., & Hartskeerl, R. A. (2006). Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 5(1), 1-10.
- Anampa, L., Rivera, H., Falcón, N., Arainga, M., & Ramírez, M. (2012). Frecuencia de *Leptospira* spp en porcinos de crianza tecnificada y de traspatio beneficiados en dos mataderos de Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(2), 240-245.
- Babudieri, B. (1958). Animal reservoirs of leptospire. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 70(3), 393-413.
- Balboni, A., Zamagni, S., Bertasio, C., Boniotti, M. B., Troia, R., Battilani, M., & Dondi, F. (2020). Identification of Serogroups Australis and Icterohaemorrhagiae in two dogs with a severe form of acute leptospirosis in Italy. *Pathogens*, 9(5), 351.

- Barragan, V., Chiriboga, J., Miller, E., Olivas, S., Birdsell, D., Hepp, C., Hornstra, H., Schupp, J., Morales, M., González M., Reyes, S., Cruz, C., Keim, P., Hartskeerl, R., Trueba, G., & Pearson, T. (2016). High *Leptospira* Diversity in Animals and Humans Complicates the Search for Common Reservoirs of Human Disease in Rural Ecuador. *PLOS Negl Trop Dis*. 10. 10.1371/journal.pntd.0004990.
- Bielanski, A. B., & Surujballi, O. (1998). *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type hardjobovis in bovine embryos fertilized in vitro. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 62(3), 234.
- Burgos Macías, D. I., Pérez Ruano, M., Bulnes Goicochea, C. A., Vera Mejía, R. R., & Fonseca Rodríguez, O. (2019). Nivel de conocimiento de la leptospirosis bovina en la provincia Manabí, Ecuador. *Revista de Salud Animal*, 41(2).
- Carpenter, J. A., Scorgie, A., & Josephson, G. (2006). *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection associated with carcass condemnation of swine at slaughter. *Journal of Swine Health and Production*, 14(3), 145-148.
- Cassanovas, A., Ghizzi, G., Wunder, E., Diggle, P., Begon, M., & Ko, A. (2018). Quantification of *Leptospira interrogans* Survival in Soil and Water Microcosms. *American society for microbiology, Applied and environmental microbiology*, 1-11.
- Céspedes, M. (2005). Leptospirosis: enfermedad zoonótica emergente. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 22(4), 290-307.
- Chou, L. F., Chen, Y. T., Lu, C. W., Ko, Y. C., Tang, C. Y., Pan, M. J., ... & Yang, C. W. (2012). Sequence of *Leptospira santarosai* serovar Shermani genome and prediction of virulence-associated genes. *Gene*, 511(2), 364-370.
- Cosate, M. R. V., Barouni, A. S., Moreira, E. C., Veloso, I. F., Gomes, M. T. R., & Salas, C. E. (2012). Molecular Characterization by LSSP-PCR and DNA Sequencing of a

- Pathogenic Isolate of *Leptospira interrogans* from Brazil. *Zoonoses and public health*, 59(6), 379-388.
- Cruz-Romero, A., Alvarado-Esquivel, C., Romero-Salas, D., Alvarado-Félix, Á. O., Sánchez-Montes, S., Hernández-Tinoco, J., & Sánchez-Anguiano, L. F. (2018). Seroepidemiology of *Leptospira* infection in backyard pigs in Durango State, Mexico. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 8(3), 87-90.
- Daher, E. D. F., Abreu, K. L. S. D., & Silva Junior, G. B. D. (2010). Leptospirosis-associated acute kidney injury. *Brazilian Journal of Nephrology*, 32, 408-415.
- Delmas, B., Jabot, J., Chanareille, P., Ferdynus, C., Allyn, J., Allou, N., ... & Vandroux, D. (2018). Leptospirosis in ICU: a retrospective study of 134 consecutive admissions. *Critical care medicine*, 46(1), 93-99.
- Díaz Ortiz, G. R. (2019). Asociación entre especies patógenas de *Leptospira* spp. y sus reservorios domésticos no roedores, dentro de una localidad urbana de la Amazonia Peruana. [Tesis de maestría, Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia]
- Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (2021). Gaceta epidemiológica de enfermedades zoonóticas: leptospirosis SE 1 a 21 Ecuador 2021. Recuperado 27 de noviembre de 2021 de <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2021/06/GACETA-Leptospira-SE-21.pdf>
- Enright, M. C., & Spratt, B. G. (1999). *Multilocus sequence typing*. *Trends in microbiology*, 7(12), 482-487.
- Guerrero, M. & Villavicencio, T. (2019). *Prevalencia de leptospirosis en cerdos y factores de riesgo en la población animal y humana del cantón Portoviejo, provincia de Manabí*. (Bachelor's thesis, Calceta: ESPAM MFL).
- Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology*, 52(5), 696-704.

- Hurtado, C. B. Y. O., & Pérez, C. L. L. (2018). Diagnóstico pasivo de nefritis intersticial en cerdos de mataderos. *Revista Científica Agroecosistemas*, 6(1), 162-167.
- Jacobs, A. A. C., Harks, F., Hoeijmakers, M., Collell, M., & Segers, R. P. A. M. (2015). Safety and efficacy of a new octavalent combined Erysipelas, Parvo and Leptospira vaccine in gilts against *Leptospira interrogans* serovar Pomona associated disease and foetal death. *Vaccine*, 33(32), 3963-3969.
- Ko, A., Goarant, C., & Picardeau, M. (2009). *Leptospira*: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature*, 736-747.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547.
- Levett P.N., Edwards C.N. (2009). *Leptospirosis*. In: Brachman P., Abrutyn E. (eds) Bacterial Infections of Humans. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09843-2_21
- Li, H. (2021). New strategies to improve minimap2 alignment accuracy. *arXiv preprint arXiv:2108.03515*.
- Martínez, G., Román, S., Vélez, A., Cabrera, E., Cantú, A., De la cruz, L., . . . De Je'sus, F. (2016). Morfometría del cerdo de traspatio en áreas rurales de México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 1-10.
- Nario Lazo, M. J. (2017). Caracterización de la crianza porcina de traspatio en el distrito de San Antonio-Huarochiri.
- Noguchi, H. (1919). ETIOLOGY OF YELLOW FEVER: I. Symptomatology and Pathological Findings of the Yellow Fever Prevalent in Guayaquil. *The Journal of experimental medicine*, 29(6), 547.
- Pappas, G., Papadimitriou, P., Siozopoulou, V., Christou, L., & Akritidis, N. (2008). The

- globalization of leptospirosis: Worldwide incidence trends. *International Journal of Infectious Disease*, 12, 351-357.
- Pinargote, C. (2012). Confirman 345 casos de leptospirosis en Manabí. *E. Diario, Entrevistador*.
- Ochoa, L. N., & Bouda, J. (2007). *Patología clínica veterinaria*. UNAM, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Stoddard, R. A., Gee, J. E., Wilkins, P. P., McCaustland, K., & Hoffmaster, A. R. (2009). Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 64(3), 247-255.
- Thaipadungpanit, J., Wuthiekanun, V., Chierakul, W., Smythe, L. D., Petkanchanapong, W., Limpai boon, R., ... & Peacock, S. J. (2007). A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. *PLoS neglected tropical diseases*, 1(1), e56.
- Vincent, A. T., Schiettekatte, O., Goarant, C., Neela, V. K., Bernet, E., Thibeaux, R., ... & Picardeau, M. (2019). Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(5), e0007270.
- Yang, C. W., Wu, M. S., Pan, M. J., Hsieh, W. J., Vandewalle, A., & Huang, C. C. (2002). The *Leptospira* outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13(8), 2037-2045.
- Zimmerman, J., Karriker, L., Ramirez, A., Schwartz, K., Stevenson, G. & Zhang, J. (2019). *Diseases of Swine*. John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/9781119350927