

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Detección de *Coxiella burnetii* en leche de bovinos del Ecuador

María Isabel Rojas Mencías

Proyecto Final presentada como requisito para la obtención del título de
Licenciatura en Biotecnología.

Quito, Febrero de 2012

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales
HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Detección de *Coxiella burnetii* en leche de bovinos del Ecuador.

María Isabel Rojas Mencías

Verónica Barragán, Msc.

Directora y Miembro del Comité

Gabriel Trueba, Ph.D.

Miembro del Comité

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Coordinadora Biotecnología

Miembro del Comité

Stella de la Torre, Ph. D.

Decana del Colegio de Ciencias

Biológicas y Ambientales

Quito, Febrero del 2012

DERECHOS DE AUTOR

© Derechos de Autor

María Isabel Rojas Mencías

2012

Dedicatoria

A mi papá y mi mamá por sus enseñanzas y esfuerzo.

A mi hermano por su paciencia y apoyo.

Agradecimientos

A Verónica Barragán, Gabriel Trueba, Renato León, Lourdes Torres, Sonia Zapata

Venancio Arahana, Mike Koziol, Diego Gangotena, Deisy PARRALES, a todos mis
compañeros de carrera y de los laboratorios, a las personas que colaboraron con la colecta
de muestras y al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Escuela de Ciencias Biológica
de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

RESUMEN

Coxiella burnetii es un cocobacilo Gram negativo intracelular estricto, cuyo reservorio animal es el ganado vacuno. Este microorganismo es el causante de la Fiebre Q, una enfermedad zoonótica transmitida hacia a los humanos a través del contacto e inhalación con fluidos de animales infectados o el consumo de leche. Se utilizó PCR en tiempo real con una sonda fluorescente TaqMan, para la detección de una secuencia repetitiva de 61-63pb del transposón IS1111. Las muestras de leche bovina analizada fueron colectadas en 9 provincias del territorio ecuatoriano escogidas aleatoriamente. El estudio encontró muestras positivas para *C. burnetii* tanto en las fronteras de Colombia y Perú, como en la provincia de Chimborazo en el Ecuador. Este trabajo representa el primer estudio en América Latina de detección de este patógeno a través de un método molecular de alta sensibilidad.

ABSTRACT

Domestic ruminants comprise one of the main animal reservoirs of *Coxiella burnetii*, an obligate intracellular Gram negative pathogen, and the causative agent of Q fever. Humans get the disease by consuming milk from infected animals and inhalation or direct contact with contaminated fluids. A Real-Time PCR assay using a TaqMan fluorescent probe was utilized in order to detect the pathogen in bovine milk. The assay targeted a 61-63bp repetitive sequence within the IS1111 transposon in *C. burnetii* present in milk samples collected from random locations in Ecuador. The assay resulted positive for such pathogen in samples collected in 2 provinces of the Colombian and Peruvian borders and in Chimborazo, one not neighbouring province. To our knowledge, this is the first study in a Latin America country in which a molecular method of high sensitivity is used to detect of *C. burnetii*.

Tabla de Contenidos

1.	Introducción.....	1
1.1.	Generalidades	1
1.2.	La Fiebre Q.....	2
1.3.	Fiebre Q en Estados Unidos	6
1.4.	Fiebre Q en Ecuador y América Latina	7
1.5.	Identificación de <i>Coxiella burnetii</i> mediante un método de alta sensibilidad	10
1.5.1.	PCR en tiempo real y la Técnica TaqMan.....	10
1.5.2.	El transposón IS1111	11
2.	Justificación.....	12
3.	Objetivo General.	13
3.1.	Objetivo Específico	13
4.	Área de estudio.....	14
5.	Metodología.	14
5.1.	Recolección de Muestras	14
5.2.	Extracción de ADN	15
5.3.	Amplificación del ADNr 16S	16
5.4.	Amplificación del transposón IS1111	16
6.	Resultados.....	18
6.1.	Control interno de la PCR.....	18
6.2.	Detección de <i>C. burnetti</i> en muestras del Ecuador	18
6.3.	Detección de <i>C. burnetii</i> en muestras de Sudamérica	18
7.	Discusión.....	19
7.1.	Ausencia de falsos negativos y estandarización del ensayo TaqMan IS1111.....	19
7.2.	Detección de <i>C. burnetti</i> en el Ecuador a través de una metodología de alta sensibilidad.	20
7.3.	Primer paso hacia el control de <i>Coxiella burnetii</i> en el Ecuador.	21
8.	Conclusiones.....	22

9.	Recomendaciones.....	22
10.	Bibliografía.....	24
11.	Tablas.....	28
12.	Figuras.....	37
13.	Anexos.....	42
13.1.	Anexo 1.....	42
13.2.	Anexo 2.....	43

Índice de Figuras y Tablas

Tabla 1.	Datos de muestras colectadas en las distintas regiones del Ecuador.,	28
Tabla 2.	Datos de muestras colectadas fuera del territorio ecuatoriano.,	28
Tabla 3.	Reactivos utilizados en la reacción de amplificación para el Ensayo ADNr 16S mediante el kit Roche LightCycler® FastStart DNA Master ^{PLUS} SYBR Green I,	29
Tabla 4.	Reactivos utilizados en la reacción de detección de la región IS111 de <i>Coxiella burnetii</i> mediante el kit ABI TaqMan Universal.,	29
Tabla 5.	Resultados de amplificación del ADNr 16S, obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1.,	30
Tabla 6.	Resultados de amplificación del ADNr 16S. Tabla obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1.,	31
Tabla 7.	Resultados de amplificación del ADNr 16S. Tabla obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1.,	32
Tabla 8.	Resultados de amplificación del ADNr 16S. Tabla obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1.,	32
Tabla 9.	Resultados de amplificación del ADNr 16S. Tabla obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1.,.....	33

Tabla 10. Resultados de amplificación del ADNr 16S. Tabla obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1.,	34
Tabla 11. Resultados de amplificación del ADNr 16S. Tabla obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1.,	35
Tabla 12. Resultados del Ensayo IS1111. Muestras positivas para la detección cualitativa de la curva de amplificación.,	36
Figura 1. Curva de amplificación para la detección cualitativa del ADNr 16S, obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1.,	37
Figura 2. Curva de amplificación para la detección cualitativa del ADNr 16S, obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1.,	37
Figura 3. Curva de amplificación para la detección cualitativa del ADNr 16S, obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1.,	38
Figura 4. Curva de amplificación para la detección cualitativa del ADNr 16S, obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1.,	38
Figura 5. Curva de amplificación para la detección cualitativa del ADNr 16S, obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1.,	39
Figura 6. Curva de amplificación para la detección cualitativa del ADNr 16S, obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1.,	39
Figura 7. Curva de amplificación para la detección cualitativa del ADNr 16S, obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1.,	40
Figura 8. Curva de amplificación para la detección cualitativa de la región IS111 de <i>Coxiella burnetii</i> , obtenida a partir del Software Bio-Rad CFX™ Manager 1.6.,	41
Figura 9. Curva de amplificación para la detección cualitativa de la región IS111 de <i>Coxiella burnetii</i> , obtenida a partir del Software Bio-Rad CFX™ Manager 1.6.,	41

1. Introducción.

1.1. Generalidades

Coxiella burnetii es una bacteria Gram negativa de distribución mundial (Baca & Paretsky, 1983). Es un cocobacilo (Murray, 2007) intracelular estricto que ingresa a la célula mediante la formación de una estructura similar a un fagolisosoma, el mismo que libera a la bacteria en presencia de un pH ácido (Seshadri et al, 2003). *C. burnetii* es una bacteria muy similar a las rickettsias, pues su genoma es igualmente pequeño, se asocia a artrópodos como las garrapatas y es sensible a la tinción Giménez (Russell-Lodrigue et al, 2009). Su entrada al citosol es pasiva, a diferencia de lo que sucede en las rickettsias (Baca & Paretsky, 1983). *C. burnetii* se replica mediante biogénesis de una vacuola parasitófora dentro de la cual se aloja, esta vacuola actúa como un fagolisosoma (Voth et al, 2009). Luego de su replicación, las células bacterianas maduran y son liberadas por el hospedador en forma de esporas, por lo que pueden sobrevivir a condiciones ambientales por períodos prolongados (Murray, 2007). Las manifestaciones clínicas producidas por este microorganismo se asemejan a aquella de las fiebres tífus, más no es una fiebre eruptiva (Baca & Paretsky, 1983). En cuanto a su genoma, ha sufrido un proceso de reducción génica y en consecuencia tiene muchos pseudogenes, además de la presencia de secuencias de inserción y transposones, características que sugieren que la bacteria no ha sido siempre un intracelular estricto (Seshadri et al, 2003).

Los reservorios de este microorganismo son animales del suborden Ruminantia, la bacteria también ha sido encontrada en ciertas especies de aves y animales silvestres (McQuiston et al, 2006) e incluso en perros y gatos (Pinsky et al, 1991) (Moodie et al, 2008). En ganado ovino, caprino y bovino, la fiebre Q se manifiesta con raquitismo, partos

prematuros y abortos ocasionales, por lo que se la ha considerado un factor de importancia en la productividad ganadera (Seshadri et al, 2003).

C. burnetii es una zoonosis, su transmisión se da por medio del consumo de leche, incluso pasteurizada, y principalmente por la inhalación de orina, heces o líquido amniótico secos presentes en los lugares de ordeño, faena o residencia de los animales (Fournier et al, 2001). La transmisión persona a persona ha sido poco estudiada por lo que estos casos reportados no tienen significancia epidemiológica a nivel mundial (Moodie et al, 2008). Estudios recientes han demostrado la presencia de la bacteria en garrapatas de ganado vacuno, constituyéndose este artrópodo como uno de los responsables de la transmisión entre animales, sin embargo la viabilidad de la misma o su transmisión directa a humanos no ha sido estudiada (Loftis et al, 2006). La resistencia a altas temperaturas, sustancias desinfectantes y valores reducidos de disponibilidad de agua, permiten a *C. burnetii* persistir en el ambiente por períodos prolongados de tiempo y por lo tanto constituirse como un microorganismo relacionado directamente con la seguridad alimentaria (Svraka et al, 2005).

1.2. La Fiebre Q

Coxiella burnetti es el agente causal de la denominada Fiebre Q. Esta enfermedad fue caracterizada por primera vez en Australia en 1935 (*Statistics and Epidemiology*). Su nombre proviene de la palabra “query”, interrogante, debido al carácter desconocido de su origen microbiológico (Fournier et al, 2001). El nombre de la bacteria, hace referencia a los científicos Frank Macfarlane Burnet y Herald Rea Cox, quienes la caracterizaron como agente causante de la Fiebre Q (Baca & Paretsky, 1983). Su distribución geográfica mundial fue publicada por primera vez en 1955 (Kaplan & Bertagna, 1955) y más recientemente en 1999 (Maurin & Raoult, 1999). Las dos publicaciones concuerdan en que

C. burnetii se encuentra en la gran mayoría de países del mundo y comprueban su curiosa ausencia en Nueva Zelanda. Mencionan además estudios en países de América Latina donde se ha encontrado muestras positivas mediante el test de fijación del complemento, entre los cuales consta Argentina, Brasil, México, Panamá y Venezuela.

La Fiebre Q es una enfermedad zoonótica cuya incidencia mundial es de difícil determinación pues los síntomas son inespecíficos, como fiebre y jaqueca (Fournier et al, 2001). Afecta principalmente a las vías respiratorias produciendo infecciones asintomáticas y neumonía atípica; hecho que ha conducido al subdiagnóstico de esta enfermedad (Q Fever, 2009). Posee mecanismos de evasión del sistema inmune del hospedador especialmente por su capacidad de modificar las células del éste y desintoxicarse en presencia de radicales libres y de enzimas hidrolíticas. Consta además de genes para la invasión y adhesión al tracto intestinal. Dado que no posee estructuras como el pili de *Salmonella*, ni moléculas como la adhesina de *Neisseria*, *C. burnetii* presenta proteínas llamadas ankyrinas (Ank A, B, C, D, F, H, I, J, K, L, M, N, O, P). Las ankyrinas de *C. burnetii* funcionan como adaptadores de membrana tanto para su translocación hacia el citosol como para la modificación de la expresión génica de la célula del hospedador y la alteración de señales celulares. Existe evidencia de que los residuos de ankyrinas en *C. burnetii* pudieron ser obtenidos por transferencia horizontal a partir de organismos eucariotas, pues estas proteínas son comunes en los mismos. (Voth et al, 2009).

Las infecciones por vía oral se dan en humanos por la ingestión de leche contaminada, estudios indican que una vez que la bacteria ha colonizado el tracto gastrointestinal, el paciente evidencia una seroconversión, lo que podría permitir al microorganismo colonizar otros órganos del hospedador (Loftis et al, 2010). Se podría generar eventualmente una respuesta inmune generalizada cuyo riesgo de generar enfermedad es aún desconocido, incluso en pacientes inmunodeprimidos (Loftis et al,

2010). El conocimiento de la fiebre Q por vía digestiva es sumamente limitado, por lo cual no ha podido ser caracterizado aún como un problema de salud pública, sin embargo existen varios estudios acerca de la infección por vía respiratoria. Se estima que el 50% de los casos de infección por vía respiratoria podrían ser asintomáticos (Voth et al, 2009), generando inmunidad a largo plazo (Baca & Paretsky, 1983).

Ha sido propuesto que la severidad de la fiebre Q, además de estar determinada por factores como la respuesta inmune, el tamaño del inoculo e incluso su localización geográfica, se deba a la expresión de ciertos genes en distintos plásmidos. Estos plásmidos fueron descritos por primera vez en la década de los ochentas e identificados como QpH1 y QpRS, el primero contiene una secuencia más corta de ADN, pues el segundo parece ser el resultado de varios eventos de inserción (Samuel et al, 1985). Sin embargo, han existido otros estudios del genoma de *C. burnetii* cuyo objetivo ha sido clasificar sus cepas relacionando diferencias genómicas con la severidad de la enfermedad que produzcan. Se han clasificado cepas de *C. burnetii* en base a variaciones en su LPS (Lipopolisacárido) y por lo tanto en sus características de asociación a la célula del hospedador. Más tarde, mediante la digestión del ADN bacteriano con enzimas de restricción, se pudo definir, a través de un SDS-PAGE (Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico), 6 grupos con relación a la presencia o ausencia de los plásmidos mencionados (Fournier, 1998). Por otro lado, ensayos de RFLP (Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción) y MLVA (Ensayo de Número Variable de Repeticiones en Tándem de Locus Múltiples) confirmaron dicha clasificación, y ensayos de microarrays con el genoma completo adicionaron 2 grupos más (Roest et al, 2011). Finalmente, el secuenciamiento de regiones espaciadoras de genes dentro del genoma bacteriano, generaron 3 grupos monofiléticos no del todo discordantes con los 6 anteriores y que además denotaron relación con los plásmidos mencionados (Russell-Lodrigue et al 2009).

De esta manera, la determinación del potencial de este patógeno para generar enfermedad se puede determinar mediante su genotipificación, en relación a la caracterización de sus plásmidos, o por un estudio de viabilidad en ensayos in vitro (Loftis et al, 2010).

El cuadro crónico parece estar asociado a pacientes inmunodeprimidos por una deficiente activación de los macrófagos (Fournier et al, 2001). Pacientes con este cuadro presentan hepatitis crónica, osteoartritis, afecciones cerebro vasculares y endocarditis, esta última se ha observado en pacientes con afecciones cardíacas previas (Voth et al, 2009). El cuadro agudo se manifiesta entre la primera y tercera semana posterior a la exposición (McQuiston et al, 2006), tiene manifestaciones clínicas similares a la de una gripe febril y presenta comúnmente neumonía. Puede además desencadenar una hepatitis granulomatosa y miocarditis, esta última aparentemente dependiente de la carga bacteriana infectiva (Fournier et al, 2001). Rara vez se han registrado casos de abortos y partos prematuros en mujeres durante el cuadro agudo (McQuiston et al, 2006), y manifestaciones de fatiga crónica posterior al cuadro agudo han sido registradas en un 10 a 30% de los casos (Moodie et al, 2008). De acuerdo a los reportes del CDC (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos), el caso se constituye crónico cuando la enfermedad ha prevalecido por un período igual o mayor a seis meses y presenta las manifestaciones clínicas antes descritas. El diagnóstico serológico de los casos crónicos puede no ser claro debido a la presencia de anticuerpos por exposición previa a la enfermedad. El caso agudo se define de manera similar a la descrita, más cefalea y la elevación de enzimas hepáticas. Los métodos de diagnóstico utilizados son: IgG, PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y métodos inmunohistoquímicos o cultivo (*Q Fever: Case Definition*). Sin embargo, la inmunofluorescencia indirecta (con anticuerpos IgA, IgG e IgM) es la metodología más utilizada a nivel mundial (Fournier et al, 2001).

1.3. Fiebre Q en Estados Unidos

La enfermedad fue identificada por primera vez en los Estados Unidos a inicios de la década de los cuarentas, sin embargo no fue hasta 1999 que este país se encontró en capacidad de reportar la enfermedad (McQuiston et al, 2006). De esta manera, el número de casos reportados en el año 2000 fue de 17 mientras que el año 2007 fue de 167. Para el año 2008, los reportes constaron ya con la caracterización de los casos crónicos y agudos. Hoy en día la enfermedad es considerada de carácter enzoótico en rumiantes (McQuiston et al, 2006) y los reportes del CDC demuestran que el 3% de la población humana común y el 10-20% de la población de riesgo serían positivos en ensayos serológicos para *C. burnetii*. La tasa de hospitalizaciones por la enfermedad ha permanecido relativamente constante entre los años 2003 y 2008. Adicionalmente, los estados más afectados han sido aquellos donde la actividad ganadera ya sea de bovinos, ovinos o caprinos es predominante, es decir los estados del centro oeste de los Estados Unidos. En cuanto a la estacionalidad de la enfermedad, entre los años 1998 y 2008, esta parece seguir un patrón de incremento en estaciones cálidas asociadas a un mayor contacto con el ambiente de residencia de los animales (*Statistics and Epidemiology*). El factor de riesgo más importante se da por razones ocupacionales, de esta manera personas que trabajen con ganado o en ranchos, tienen un riesgo de hasta diez veces mayor de exposición (McQuiston et al, 2006).

Coxiella burnetii se encuentra en la categoría B de agentes infecciosos potenciales a ser usados como armas biológicas (Moodie et al, 2008). De acuerdo al CDC en esta categoría se encuentran además microorganismos como *Brucella*, *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* O157:H7, *Burkholderia*, *Ricinus communis*, *Clostridium perfringens*, *Rickettsia prowazekii*, *Streptococcus* y virus causantes de encefalitis. Los criterios que se han seguido para categorizar estos microorganismos son, su diseminación, morbilidad, mortalidad y

esfuerzos de control, todos estos de carácter moderado (*Bioterrorism Agents/Diseases*). El Servicio de Inteligencia para la Prevención de Epidemias de los Estados Unidos ha considerado estos microorganismos como posibles armas de bioterrorismo de categoría B, con el objetivo de descartar un sesgo frente al pensamiento común de que un arma biológica de alto riesgo debe ser transmitida vía aerosol, y como consecuencia causar epidemias inmediatas. *C. burnetii* ha sido encontrada en el 0.1% de los casos de sospecha de bioterrorismo estudiados desde 1988 y 1999 (Ashford et al, 2003). Una de las inquietudes más importantes acerca de *C. burnetii* como agente de bioterrorismo es que al estar contenida en leche de vacunos, la cual es ampliamente comercializada en todo el mundo, el acceso al microorganismo es visualmente ilimitado (Loftis et al, 2006). Como medida preventiva y profiláctica post exposición, se ha designado el uso de dosis de doxiciclina en adultos y niños sanos, y de trimetoprin-sulfametoxazol en mujeres embarazadas. La administración de las drogas mencionadas está planificada para 8 a 12 días posterior a la exposición para detener la enfermedad, en cuyo caso si bien el período de incubación permanecería igual o dependiente únicamente de la dosis bacteriana, la prevención de muerte sería significativa (Moodie et al, 2008).

El caso de los Estados Unidos constituye un precedente importante para el estudio de *C. burnetii* en el resto del mundo. Es por lo tanto, relevante para países en vías de desarrollo como el Ecuador, que enfrentan carencias en el ámbito de la salud pública (*Ecuador*).

1.4. Fiebre Q en Ecuador y América Latina

La Fiebre Q ha sido reportada en países de América Latina como Brasil, Perú, Colombia, Venezuela y Ecuador, sin embargo poco se conoce sobre la incidencia de esta enfermedad.

Entre los años 2001 y 2004, se llevó a cabo un estudio longitudinal en la cuenca amazónica del Ecuador, con el fin de identificar el agente etiológico de un brote de enfermedades febriles y poder capacitar a los profesionales de la salud acerca de su diagnóstico, tratamiento y de generar estrategias de prevención. El estudio se llevó a cabo en pacientes del Hospital Vozandes del Oriente en el pueblo de Shell (Pastaza) y el Hospital de la IV División de Amazonas en Puyo (Pastaza), el grupo de estudio estuvo compuesto por niños de 0 a 17 años, adultos desde 18; las muestras fueron procesadas en el U.S. Naval Medical Research Center Detachment en Perú. La metodología se centró primero en agentes etiológicos virales, para lo cual se realizaron cultivos celulares, ensayos de inmunofluorescencia con anticuerpos virales específicos, RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa) y se corrieron un ELISAs (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas) para identificar presencia de IgM específicos para cada virus. En aquellas muestras negativas para las patologías virales buscadas, se corrió un test serológico con kits de PanBio para determinar agentes etiológicos bacterianos. Finalmente, para detectar Malaria, se utilizó un test de frotis sanguíneo estándar. Entre los agentes etiológicos encontrados, *Leptospira* fue el más prevalente pues constituyó el 13.2% de los casos, mientras *Coxiella burnetii* el 4.9%. Para la mayoría de los agentes etiológicos testeados en este estudio, entre los que se encuentra *C. burnetii*, los factores de edad, sexo y cuadro clínico, no fueron patrones de discriminación, lo que confirma la dificultad de su diagnóstico especialmente en zonas aisladas (Manock et al, 2009). Hasta ese momento, *C. burnetii* no había sido identificada en el país y posterior a este estudio, no se ha realizado ninguna investigación acerca de la fiebre Q

En un estudio realizado en Brasil entre los años 2004 y 2005, se analizaron muestras de suero sanguíneo de trabajadores y visitantes de la zona rural del Chaco. Las muestras se sometieron a micro-inmunofluorescencia indirecta con el fin de detectar

Rickettsia rickettsii, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana* y *Ehrlichia chaffeensis*. *C. burnetii* resultó seropositiva en un 3.9% de las muestras. El estudio identificó además que en ensayos serológicos la bacteria presenta reactividad cruzada con algunas especies de *Bartonella*. *C. burnetii* fue reportada en Brasil por primera vez en los años setentas, desde entonces este es el único estudio que ha reconocido su relevancia en cuanto a la salud pública de este país. (Gonçalves de la Costa et al, 2005)

El primer estudio realizado en Colombia se llevó a cabo en el año 2003 mediante inmunofluorescencia indirecta en el suero de trabajadores, entre los 16 y los 65 años de edad, residentes de los departamentos ganaderos de Córdoba y Sucre. El estudio concluyó que el 23.6% de las muestras eran seropositivas para anticuerpos IgG específicos para *C. burnetii*, porcentaje similar al encontrado para *Bartonella* spp. y *Anaplasma phagocytophilum*. (Parra & Mattar, 2006)

En el año 2002 se llevó a cabo en el Perú, en la zona agrícola de Sapillica, una investigación para buscar el agente etiológico de una epidemia de enfermedad febril. Ensayos de ELISA e inmunofluorescencia indirecta llevados a cabo por el Ministerio de Salud y el U.S. Naval Medical Research Center Detachment, revelaron que el 9% de las muestras eran positivas para *C. burnetii* (Blair et al 2004).

En Venezuela, motivados por la alta incidencia de abortos y partos prematuros en ganado caprino, se realizó un estudio de diagnóstico de *C. burnetii* mediante ensayos de ELISAi. El estudio concluyó que la seroprevalencia en la Parroquia Trinidad Samuel, fue del 60,63%. El artículo del estudio descrito menciona los datos de seroprevalencia de la bacteria en el ganado caprino de Argentina y Méjico de, 35% y 38%, respectivamente. (Orpeza et al, 2010)

Se observa que los valores de positividad de *C. burnetii* para los países mencionados, no son despreciables, sin embargo en ninguno de ellos se han desarrollado proyectos de investigación que busquen establecer un plan de conocimiento, control y prevención de la enfermedad.

1.5 Identificación de *Coxiella burnetii* mediante un método de alta sensibilidad

1.5.1 PCR en tiempo real y la Técnica TaqMan

El PCR en tiempo real consiste en una reacción de PCR convencional en la cual la amplificación del fragmento blanco y su cuantificación suceden al unísono, lo que descarta la necesidad de visualizar el amplicón en un gel, pues el ensayo genera curvas de fluorescencia equivalentes. El PCR en tiempo real basado en la técnica consiste en el uso de una sonda marcada con un fluoróforo (Loftis et al, 2006). Este estudio utiliza una de las técnicas TaqMan con un mecanismo que se basa en la tecnología FRET (Florescence Resonance Energy Transfer) pues dos moléculas, una llamada “quencher” situada en el extremo 5` de la sonda y otra “reportero” en el extremo 3`. Al momento que la sonda, que constituye un fragmento específicamente diseñado de nucleótidos, reconoce su región complementaria en la cadena de ADN blanco se pega a este. La polimerasa sintetiza la nueva cadena al momento que ejerce su actividad exonucleasa sobre la sonda, lo que provoca el desprendimiento del “reportero” y finalmente del “quencher”. Cuando juntos en la sonda, el “quencher” actúa negativamente sobre el “reportero”, así que al desprenderse este último de la sonda, emite fluorescencia. A medida que se sintetiza una nueva copia de la secuencia blanco, el aparato lee la fluorescencia emitida por el reportero y genera curvas de fluorescencia, bien para una detección cualitativa o cuantitativa del producto.

La valoración de los resultados se hace mediante la obtención del número de ciclos de la reacción de amplificación necesarios para que la fluorescencia detectada sobrepase el valor de aquella del umbral (C_t). El umbral es el nivel de fluorescencia detectada sobre el cual se descarta la detección de fluorescencia emitida por otros componentes de la reacción. Mientras mayores son los valores de C_t , menor es la cantidad del producto de la amplificación, por lo que la determinación de rangos de este valor para los distintos ensayos es necesaria para descartar falsos positivos. (Chen & Sullivan, 2003) El aparato que detecta la fluorescencia emitida por el reportero de la sonda, genera un gráfico de fluorescencia versus el C_t , es decir el número de ciclos de amplificación de la secuencia blanco (Anexo 1). Se evalúa entonces el C_t en el cual la curva muestra que la fluorescencia captada se levanta por sobre el umbral.

1.5.2 El transposón IS1111

El elemento IS111 es responsable de la plasticidad del genoma mediante inserciones, deleciones e inversiones de porciones de este (Seshadri et al, 2003). El número de copias dentro del genoma de la bacteria puede variar entre 12 y 48 (NAU, mediante análisis in-sílico). Las distintas copias del transposón difieren en sitios de restricción y secuencias y por lo tanto en regiones de sus estructuras secundarias (Seshadri et al, 2003). Ha sido clasificada como transposón pues posee secuencias repetidas invertidas en los extremos, una de 12pb y otra de 7pb localizadas a distancias diferentes en cada copia del IS1111, debido a las diferencias en las longitudes de las secuencias. La zona situada entre estas secuencias invertidas repetidas del extremo 3' es la menos estable del transposón (Hoover et al, 1992). El IS1111 posee 2 ORFs (Marcos Abiertos de Lectura), después del mayor se encuentra una región rica en purinas similar a los sitios de iniciación de la traducción comunes en procariotas, y cerca de esta región un promotor consenso similar a

uno de los de *E. coli*. (Hoover et al, 1992). Cercano a esta región se encuentran además genes que codifican para proteínas de adhesión con secuencias similares a las de otras bacterias (Hoover et al, 1992), al igual que sucede con las secuencias de sus genes para transposasas, cuya similitud, cercana al 99%, sugiere que estos cassettes han sido adquiridos hace poco o han sufrido una evolución convergente (Seshadri et al, 2003). La región IS1111 posee además secuencias repetitivas características del género *Coxiella* que pueden estar presentes de 10 a 100 veces por célula (NAU, comunicación personal), de aquí la importancia de la amplificación de estas secuencias repetitivas para la detección de *Coxiella* mediante técnicas de PCR en tiempo real.

En este estudio se analizan muestras de leche de bovinos y caprinos de distintas localidades del territorio ecuatoriano con el propósito de buscar la presencia de *C. burnetti*. La metodología descrita en el presente proyecto se basa en la identificación de una o varias copias de una secuencia repetida presente en el transposón IS111, a partir de muestras de leche de vacuno, para la identificación de *Coxiella burnetii* mediante PCR en tiempo real utilizando tecnología TaqMan.

2. Justificación.

En la sección anterior se mencionó varios reportes de fiebre Q en países latinoamericanos incluyendo al Ecuador. Sin embargo muchos de estos estudios se los ha llevado a cabo mediante serología, método sujeto a reacción cruzada con otros patógenos y por ende a la presencia de falsos positivos. De esto se deriva la importancia de realizar estudios que utilicen métodos de detección de *C. burnetii* mediante técnicas con alta especificidad. Por otro lado, los estudios se han centrado en la investigación de agentes

patógenos en pacientes humanos febriles con síndromes indiferenciados, por lo que se desconoce la situación real de la fiebre Q. Adicionalmente, debido a la falta de registros de fiebre Q en animales domésticos en el Ecuador, se ha asumido que en nuestro país no existe esta enfermedad. Sin embargo, la presencia de anticuerpos contra *C. burnetti* en pacientes febriles (Manock et al, 2009) claramente sugiere su circulación y por lo tanto la necesidad de realizar estudios que determinen su prevalencia en el Ecuador.

En la Constitución ecuatoriana, en el artículo 13 se detalla lo siguiente: “*El derecho a la alimentación incluye el acceso libre y permanente a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para una alimentación sana...*”. Sin embargo, a pesar de que existe una Ley Orgánica de Régimen de Soberanía Alimentaria, esta no designa un organismo efector específico más allá de la posible intervención de los municipios u organismos de salud pública (*Ley Orgánica de Régimen de Soberanía Alimentaria*). De aquí la relevancia del presente proyecto en un mejor conocimiento de la epidemiología de la fiebre Q y determinación de su prevalencia para la creación de políticas de control y manejo de esta enfermedad en el Ecuador.

3. Objetivo General.

El objetivo principal del presente estudio es determinar la presencia de *Coxiella burnetii* en muestras de leche de bovinos del Ecuador.

3.1 Objetivo Específico

Emplear la tecnología del PCR en tiempo real a través del método TaqMan para la detección de *C. burnetii* en muestras de leche.

4. Área de estudio.

Para este estudio se colectaron muestras dentro del territorio ecuatoriano y en países vecinos. Las muestras del Ecuador pertenecen a distintas granjas localizadas en 9 provincias del territorio ecuatoriano: Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Chimborazo, Loja, Guayas, Pastaza y Galápagos. Las muestras de Colombia, de leche y crema cruda, provienen de la zona colindante con el territorio ecuatoriano, Rumichaca y las muestras de leche tratada de zonas lecheras del país. Las muestras de Perú corresponden a leche tratada adquirida en la zona de Tumbes, en la frontera con el Ecuador. La muestra de Argentina es asimismo leche tratada adquirida en Buenos Aires Capital Federal. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ).

5. Metodología.

5.1. Recolección de Muestras

Fueron colectadas un total de 102 muestras de leche de bovino, en 9 provincias del Ecuador (Tabla 1). Adicionalmente se colectaron muestras de países vecinos, 3 corresponden a muestras de leche tratada del Perú, 1 de leche tratada del Argentina, 2 de leche tratada y 2 de crema cruda de Colombia (Tabla 2). La raza del bovino, el tamaño de la granja y el nivel de tecnificación de su método de ordeño no fueron considerados como factores discriminatorios. Las muestras fueron colectadas en tubos de 50mL estériles y almacenadas a -20°C hasta ser procesadas.

El presente proyecto no posee una sección de análisis estadístico de resultados pues se centra en el sondeo (muestreo aleatorio no estratificado) de presencia de *Coxiella burnetii* en el territorio ecuatoriano, más no en la determinación de la incidencia y/o persistencia de la bacteria en el ganado.

5.2. Extracción de ADN

El protocolo de extracción fue proporcionado por el Dr. Paul Keim del Centro de Genética Microbiana en NAU. Las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente. El procedimiento consistió en la adición de 20µl de proteinasa K a 500 µL de muestra, para su posterior incubación a 56°C por 1 hora, para que la enzima actúe lisando las células animales para la liberación del material genético (Walsh et al, 1991). Posteriormente, se centrifugó las muestras a 11.219xg por 5 minutos, después de lo cual se descartó el sobrenadante y se retiró la grasa restante con un hisopo estéril. En el fondo del tubo se pudo observar un pellet sobre el cual se adicionó 500µL de una solución de Chelex al 5% y se dejó incubar a 95°C por 20 minutos. Durante este tiempo, el Chelex (BioRad), una resina quelante permitió almacenar el ADN bacteriano re-suspendido en un ambiente libre de nucleasas y residuos lipídicos e inhibidores del PCR (Walsh eta al, 1991). Finalmente, se centrifugó las muestras a 15.584xg por 7 minutos para la obtención de un sobrenadante que contendrá el ADN bacteriano. Todas las muestras fueron cuantificadas en el Nanodrop y corridas en un gel de agarosa 1% con un SimplyLoad® DNA QuantLadder (LONZA). Ninguna muestra dio bandas ni lecturas, por lo que se cree que las concentraciones de ADN fueron bajas y se encontraban fuera de los rangos utilizados de sensibilidad del aparato, como lo corroboró el Laboratorio de NAU. Las muestras fueron almacenadas a -20°C.

5.3. Amplificación del ADNr 16S

Con el propósito de descartar la presencia de compuestos inhibidores de la reacción de PCR en las muestras, se corrió en estas un ensayo para amplificar una región del 16S del ARN ribosoma bacteriano. Para esto se emplearon un par de “unlabeled” primers (*Integrated DNA Technologies*), con las siguientes secuencias:

16S-F 5'-CIC CTA CGG GIG GCW GCA C-3'

16S-R 5'-GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT-3'

La amplificación se llevó a cabo en un aparato Roche LightCycler[®] 1.5. Se utilizó el kit de Roche LightCycler[®] FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I, con su correspondiente protocolo para la preparación de las reacciones (Tabla 3). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes (Loftis et al, 2006): 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 50 ciclos (95°C por 15 seg, 60°C por 1 min), 95°C por 15 seg, 55°C por 15 seg, 95°C por 15 seg. El canal de lectura en el que se programó el aparato fue de 530nm, longitud de onda a la cual se detecta la emisión de fluorescencia del SYBR que se ha intercalado en el ADN blanco. El tamaño del producto esperado es de aproximadamente 470pb, que ha sido determinado en el Laboratorio de Genética Microbiana y Genómica de NAU, mediante análisis in-sílico. El control positivo usado corresponde a la muestra 62C (Tabla 1), la misma que tuvo resultados consistentes a lo largo de todos los ensayos de estandarización del protocolo.

5.4. Amplificación del transposón IS1111

A partir de un estudio realizado por Loftis et al. en el 2006, se identificó mediante secuenciamiento del transposón IS111, una secuencia repetitiva presente de 10 a 100 veces

por microorganismo que codifica para una transposasa (Loftis et al, 2006). Adicionalmente, dicho laboratorio diseñó una sonda adecuada para su amplificación, la cual fue entregada al Laboratorio de Microbiología de la USFQ con el protocolo a continuación. La amplificación se llevó a cabo en un aparato BioRad CFX96™ Real-Time PCR Detection System. Se utilizó el kit de ABI (Applied Biosystems) TaqMan Universal, con su correspondiente protocolo para la preparación de las reacciones (Tabla 4). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes (Loftis et al, 2006): 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 50 ciclos (95°C por 15 seg, 60°C por 1 min). El canal de lectura en el que se programó el aparato fue el de 530nm, longitud de onda a la cual se detecta la fluorescencia del la sonda 6-FAM (6-Carboxyfluoresceína), el cual se excita a 492nm y emite a 517nm (Biocompare Inc., Green emitters). El control positivo usado corresponde a la muestra 55C, la misma que se encontró como positivo en ensayos realizados en NAU. El tamaño de la secuencia repetitiva es de 61 a 63pb, que ha sido determinado en NAU, mediante análisis in-silico. Los primers seleccionados tienen las siguientes secuencias (Loftis eta al, 2006):

IS1111-F 5'-CCGATCATTGGGCGCT-3'

IS1111-R 5'-CGGCGGTGTTTAGGC-3'

La sonda utilizada (IS1111P) posee un reportero 6-FAM y un quencher BHQ en la siguiente secuencia (Loftis et al, 2006):

IS1111-P 5'-TTAACACGCCAAGAAACGTATCGCTGTG-3'

Esta sonda identifica una secuencia repetitiva presente en una transposasa de la región IS1111. Mediante el uso del proGrama Primer3 Input (v. 0.4.0) MIT, se pudo determinar la secuencia blanco amplificada (Anexo 2).

6. Resultados.

6.1. Control interno de la PCR

Con la finalidad de descartar la presencia de compuestos inhibitorios en la PCR se utilizó como control interno, la amplificación del gen que codifica para el ADNr 16S. Este ensayo fue positivo para las 110 muestras analizadas (Tablas 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11). Las curvas de amplificación obtenidas (Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7) son relativamente uniformes y denotan detección de fluorescencia, resultado de la emisión del SYBR al intercalarse a las nuevas copias del ADN blanco. Los valores de Ct registrados tienen un rango de entre 9.29, en la muestra 8 (Tabla 9), y 30.10, en la muestra 65 (Tabla 6).

6.2. Detección de *C. burnetti* en muestras del Ecuador

Las muestras provenientes de la región de Chambo, provincia de Chimborazo, número 53C, 54C y 55C, dieron resultados positivos con un Ct de 36.62, 32.73 (promedio de los Ct obtenidos en las repeticiones: 32.66, 33.21, 32.31) y 37.10, respectivamente (Tabla 12, Figuras 8 y 9).

6.3. Detección de *C. burnetii* en muestras de Sudamérica

Dos de las tres muestras del Perú, 402A y 403A, resultaron positivas con un Ct de 36.16 y 36.10, respectivamente. Solo una de las cuatro muestras provenientes de Colombia

resultó positiva, la muestra 407, con Ct de 37.32 correspondiente a crema de leche cruda. La muestra proveniente de Argentina fue negativa (Tabla 12, Figuras 8 y 9).

7. Discusión.

7.1. Ausencia de falsos negativos y estandarización del ensayo TaqMan IS1111.

Todas las muestras analizadas fueron positivas para la amplificación del ADN_r 16S (ADN bacteriano), lo que es un indicativo indirecto de la ausencia de falsos negativos en aquellas muestras no reactivas para el ensayo de detección de *C. burnetti* (TaqMan IS111). Para las muestras de leche tratada, estos resultados son coherentes con el objetivo del proyecto en cuestión, el cual se centró en detectar la presencia del patógeno más no su viabilidad.

Debido a que la metodología utilizada en el presente estudio no había sido probada en el Ecuador se envió, a manera de control externo, un grupo de muestras seleccionadas aleatoriamente para ser analizadas por el Dr. Paul Keim en el Laboratorio de Genética Microbiana y Genómica de NAU. A pesar de existir evidencia de que el equipo utilizado en NAU (ABI) pudo ser significativamente más sensible que el utilizado en Ecuador (Bio Rad), los resultados de las pruebas realizadas en NAU fueron consistentes con los resultados en el Ecuador, pues se evidenció similitud en los valores de Ct obtenidos en las muestras que fueron positivas para ambos (Tabla 12). Según el laboratorio en NAU (comunicación personal) los valores óptimos de Ct para la posterior genotipificación de una muestra oscilan entre 32.3 y 37. Todos los Ct obtenidos en este estudio se encuentran dentro de este rango, lo que denota una eficiente estandarización del método TaqMan de PCR en tiempo real.

7.2 Detección de *C. burnetti* en el Ecuador a través de una metodología de alta sensibilidad.

Es importante mencionar que la detección de la bacteria, aún en etapas en la que el animal se encuentre eliminando baja carga bacteriana, es necesario para el control de infecciones agudas y crónicas en los distintos grupos de animales (Kim et al, 2005). Al ser suficientes alrededor de 10 microorganismos para generar la enfermedad (Cornelis et al, 2011), el uso de una metodología de alta sensibilidad y rapidez es indispensable, especialmente en países en vías de desarrollo que enfrentan problemáticas múltiples de salud pública (*Ecuador*) (Manock et al, 2009).

La alta sensibilidad de esta técnica ha sido probada en varias ocasiones. Un estudio realizado en material placentario demostró que la sensibilidad de la técnica del PCR en tiempo real es hasta cien veces mayor que la detección por métodos serológicos (Silke et al, 2006), además de su rapidez en la generación de resultados. Por otro lado, esta técnica fue utilizada en Holanda a mediados del 2010 para identificar a *C. burnetii* como el agente causal de un brote epidémico, a partir muestras de suero y tejido humanos (Cornelis et al, 2011). La identificación fue realizada mediante un protocolo de ABI y la región amplificada perteneció a aquella de la secuencia de inserción IS1111. Este protocolo permitió la detección de más de 4000 individuos infectados de los cuales 60% fueron asintomáticas. Otros métodos moleculares como RFLP y MLVA han sido utilizados para la identificación de *C. burnetti*, sin embargo estas metodologías enfrentan la dificultad del cultivo bacteriano, así como la disponibilidad de medios de transporte específicos, dado que generalmente las granjas ganaderas se encuentran ubicadas en zonas rurales. En el presente estudio, la sonda utilizada se ha ligado a 10 a 100 secuencias blanco repetidas a lo largo del transposón IS1111 por cada célula bacteriana (Loftis et al, 2006), lo que evidencia la mayor especificidad de la técnica TaqMan, en contraste con el PCR

convencional y otras técnicas moleculares. De esta manera, gracias a su alta sensibilidad y especificidad, la tecnología usada en esta investigación es de importancia para la identificación de *Coxiella burnetii* a partir de gran variedad de muestras.

7.3 Primer paso hacia el control de *Coxiella burnetii* en el Ecuador.

Previo a este estudio, la presencia de *C. burnetii* en el Ecuador había sido detectada serológicamente en una ocasión en pacientes humanos febriles en la Amazonia ecuatoriana. Este es el primer reporte de detección de este patógeno en leche de bovino y probablemente es el primer diagnóstico de fiebre Q en el que se utilizó PCR en tiempo real en el Ecuador. Las regiones de las que provinieron las muestras positivas no presentan un patrón de distribución. De esta manera, las muestras colectadas en localidades aledañas no presentan el mismo resultado, lo cual puede atribuirse al confinamiento del ganado que minimiza el contacto entre individuos. De aquí la importancia del conocimiento y manejo de las barreras de contagio para el entendimiento de la epidemiología de la enfermedad.

Este estudio evidencia la infección del ganado vacuno Ecuatoriano con *C. burnetii*. A pesar de haberse detectado la presencia de ADN de *C. burnetii*, no se puede asegurar que el Ecuador tiene un problema de salud pública asociado a la fiebre Q. En otros países como Brasil (Gonçalves de la Costa et al, 2005), Venezuela (Orpeza et al, 2010), Perú (Blair, 2004) y Colombia (Parra & Mattar, 2006), los estudios de identificación de *C. burnetii* se han centrado en ensayos serológicos. Por otro lado, en Holanda se utilizó la metodología descrita en este estudio para diagnosticar a más de 4.000 casos de fiebre Q en una epidemia en el año 2010. De manera que al momento, Estados Unidos (Loftis et al, 2006), Holanda (Cornelis et al, 2011) y con el presente proyecto, el Ecuador, son los únicos países del mundo que han usado la tecnología del PCR en tiempo real TaqMan para la detección de este microorganismo. Por lo tanto, sus resultados constituyen un punto de

partida para futuros estudios de prevalencia, transmisión y control de fiebre Q, que a su vez sean la base de políticas de salud mejor dirigidas.

8. Conclusiones.

El PCR en tiempo real mediante la tecnología TaqMan es un método de alta sensibilidad y especificidad, que permite la detección de *Coxiella burnetii* a partir de muestras de leche cruda y tratada de bovino.

Este es el primer reporte de fiebre Q en el Ecuador en los últimos diez años, estudios anteriores fueron realizados principalmente mediante la detección de anticuerpos contra *C. burnetii*, más no a través de un método molecular.

El presente estudio constituye un referente hacia la creación de políticas de salud pública para un mejor conocimiento y control de esta zoonosis.

9. Recomendaciones.

- Como consecuencia de un incremento en el precio de la leche en el mercado se genera un aumento posterior de la producción de leche en el Ecuador. Al incentivar esto una sobreoferta, el precio del mercado baja, lo que finalmente resulta en un déficit de 10mil tn/año. Como estrategia de compensación el estado Ecuatoriano importa un porcentaje no despreciable de leche en polvo (La Sierra aporta el 75% de la producción lechera). Por lo tanto, una prospección acerca de en qué medida *Coxiella burnetii* constituiría una amenaza para la salud pública ecuatoriana, debe

incluir un muestreo estadísticamente significativo de la leche importada. Sin embargo hay que tener en cuenta que la pasteurización disminuye el riesgo de contagio.

- Investigación de *Coxiella burnetti* en material proveniente de abortos en granjas ganaderas ovinas, caprinas y bovinas ecuatorianas.
- Identificación de factores ambientales/genéticos que determinen la persistencia de una u otra especie de *Coxiella*.
- Implementación de modelos de manejo del ganado para prevenir la transmisión.
- Estudios estadísticos de prevalencia e incidencia de fiebre Q en humanos mediante variables de género, edad y ocupación de los sujetos de estudio.
- Creación de planes de control epidemiológico que permitan al Ecuador participar en programas piloto de vacunación similares a los vigentes en Holanda (Hermans et al, 2011).

10. Bibliografía

- Ashford, D., et al. (2003). Planning against Biological Terrorism: Lessons from Outbreak Investigations. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 9, No. 5, pp. 515-519.
- Baca, O. & Paretsky, D. (1983). Q Fever and *Coxiella burnetii*: a Model for Host-Parasite Interactions. *Microbiological Reviews*. Vol. 47, No. 2, p. 127-149.
- Blair, P. et al. (2004). Evidence of Rickettsial and Leptospira Infections in Andean Northern Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70(4), pp. 357-363.
- Bioterrorism Agents/Diseases. CDC. Obtenido el 7 de octubre de 2011 desde <http://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp#catdef>
- Cámara de Agricultura de la I Zona. Obtenido el 7 de enero de 2011 desde <http://www.agroecuador.com/web/index.php/quienes-somos>
- Chen, X. & Sullivan, P. (2003). Review: Single nucleotide polymorphism genotyping biochemistry, protocol, cost and throughput. *The Pharmacogenomics Journal*, Nature Publishing Group. 3, pp. 77-96.
- Constitución de la República del Ecuador. 2008. Art. 13.
- Cornelis, J. et al. (2011). Single-Nucleotide-Polymorphism Genotyping of *Coxiella burnetii* during a Q Fever Outbreak in The Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 77, No. 6, pp. 2051-2057.
- Ecuador. OMS. Obtenido el 7 de enero de 2011 desde <http://www.who.int/countries/ecu/es/>
- Fournier, P., Marrie, T., Raoult, D. (1998). MINIREVIEW Diagnosis of Q Fever. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 36, No. 7, pp. 1823-1834.

- Fournier, P., Etienne, J., Harle, J., Habib, G., Raoult, D. (2001). Myocarditis, a Rare but Severe Manifestation of Q Fever: Report of 8 Cases and Review of the Literature. *Clinical Infectious Disease*. 32:1440-7.
- Gonçalves de la Costa, P., Brigatte, M., Greco, D. (2005). Antibodies to *rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Vol. 100, No. 8, pp. 853-859.
- Hermans, M., Huijsmans, C., Schellekens, J., Savelkoul, P. & Wever, P. (2011). *Coxiella burnetii* DNA in goat milk after vaccination with Coxevac®. *Vaccine*. 29: 2653-2656.
- Hoover, T., Vodkin, M., Williams, J. (1992). A *Coxiella burnetii* Repeated DNA Element Resembling a Bacterial Insertion Sequence. *Journal of Bacteriology*. Vol. 174, No. 17, pp. 55404-5548.
- Kaplan, M. & Bertagna, P. (1955). The Geographical Distribution of Q Fever. *Bull. Org. mon. Santé. Bull. Wld Hlth Org*. 13, 892-860.
- Ley Orgánica de Régimen de Soberanía Alimentaria. 2009. Capítulo IV.
- Loftis, A., et al. (2006). Rickettsial agents in Egyptian ticks collected from domestic animals. *Exp Appl Acarol*. 40:67-81.
- Loftis, A., Priestley, R., Massung, R. (2010). Detection of *Coxiella burnetii* in Commercially Available Raw Milk from the United States. *Foodborne Pathogens and Disease*. Vol. 7, No. 12, pp.1553-1556.
- La sierra aporta el 75% de la producción lechera. (8 de enero de 1999). *Explored, Diario HOY*. Obtenido el 7 de enero de 2011 desde <http://www.explored.com.ec/noticias-ecuador/la-sierra-aporta-el-75-de-la-produccion-lechera-106090-106090.html>

- Manock, S. et al. (2009). Etiology of Acute Undifferentiated Febrile Illness in the Amazon Basin of Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (81)1, pp. 146-151.
- Maurin, M. & Raoult, D. (1999). Q Fever. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 12, No. 4, pp. 518-553.
- McQuiston, J., et al. (2006). National Surveillance and the Epidemiology of Human Q Fever in the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75(1), pp. 36-40.
- Moodie, C., Thompson, H., Meltzer, M., Swerdlow, D. (2008). Prophylaxis after Exposure to *Coxiella burnetii*. *Emerging Infectious Disease*. Vol. 14, No. 10, pp. 1558-1566.
- Murray, P., Rosenthal, K. & Pfaller, M. (2007). *Microbiología Médica*. 5ta Edición, ELSEVIER, Madrid. pp. 460-462.
- Orpeza, M., Dickenson, L., Maldonado, J., Kowalski, A. (2010). Seropositividad a *Coxiella burnetii* en cabras de la parroquia Trinidad Samuel del municipio Torres, estado Lara, Venezuela. *Zootecnia Trop.* 28(4), pp. 557-560.
- Parra, M. & Mattar, S. (2006). Detection of Antibodies to *Anaplasma*, *Bartonella* and *Coxiella*, in rural Inhabitants of the Caribbean area of Colombia. *Rev. MVZ Córdoba*. 11(2), PP. 781-789.
- Pinsky, R., Fishbein, D., Green, C., Gensheimer, K. (1991). An Outbreak of Cat-Associated Q Fever in the United States. *The Journal of Infectious Disease*. Vol. 164, No. 1, pp. 202-204.
- Q Fever. (2009). CDC. Obtenido el 7 de enero de 2011 desde <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/qfever/>
- Q Fever: Case Definition. CDC. Obtenido el 11 de febrero de 2011 desde http://www.cdc.gov/osels/ph_surveillance/nndss/casedef/q_fever_2009.htm

- Roest, H. et al. (2011). Molecular Epidemiology of *Coxiella burnetii* from Ruminants in Q Fever Outbreak , the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 17, No. 4, pp. 668-675.
- Russell-Lodrigue, K. et al. (2009). *Coxiella burnetii* Isolates Cause Genogroup-Specific Virulence in Mouse and Guinea Pig Models of Acute Q Fever. *Infection and Immunity*. Vol. 77, No. 12, pp. 5640-5650.
- Samuel, J., Frazier, M., Mallavia, L. (1985). Correlation of Plasmid Type and Disease Cused by *Coxiella burnetii*. *Infection and Immunity*. Vol. 49, No. 3, pp. 775-779.
- Seshadri, R., et al. (2003). Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *PNAS*. Vol. 100, No. 9, pp. 5455-5460.
- Silke, K., Ellenbrok, H., Tyczka, J., Franz, T & Appel, B. (2006). Evaluation of Real-Time PCR Assay to Detect *Coxiella burnetii*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1078: 563-565.
- Statistics and Epidemiology. *CDC*. Obtenido el 7 de enero de 2011 desde <http://www.cdc.gov/qfever/stats/index.html>
- Kim, S., Kim, E., Lafferty, C. & Dubovi, E. (2005). *Coxiella burnetii* in Bulk Tank Milk Samples, United States. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 11, No. 4, pp. 619-621.
- Svraka, S., Toman, R., Skultety, L., Slaba, K. & Homan, W. (2005). Establishment of genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol Lett.* 254:268-274.
- Voth, D., et al. (2009). The *Coxiella burnetii* Anyrin Repeat Domain-Containing Potein Family Is Heterogeneous, with C-Terminal Truncations that Influence Dot/Icm-Mediated Secretion. *Journal of Bacteriology*. Vol. 191, No. 13, pp. 4232-4242.
- Walsh, P., Metzger, D., Higuchi. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR.based typing fron forensic material. *Bio Techniques*. 10:Abstract

11. Tablas

Tabla 1. Datos de muestras colectadas en las distintas regiones del Ecuador.

Muestra #	Locación	Provincia
1B, 2 ^a	Uyumbicho UCE	Pichincha
3A, 4B, 5C, 6A, 7B	Latacunga	Cotopaxi
8C, 9A, 10A, 11A, 12 ^a	Pastocalle	Cotopaxi
13A, 14 ^a	Cotopaxi	Cotopaxi
15A, 16A, 17A, 18A, 19A, 20C, 21C, 22A, 23A, 24A, 25B, 26A, 27A, 28A, 29A, 30C, 31A, 32 ^a	El Ángel	Carchi
33AyB, 34, 35A, 36C	Vilcabamba	Loja
37AyB, 38A, 39A, 40A, 41 ^a	Lloa	Pichincha
42C, 43C, 44A, 45A, 46A, 47C, 48A, 49A, 50A, 51A	Machachi	Pichincha
52A, 53C, 54A, 55C, 56 ^a	Chambo	Chimborazo
57A, 58A, 59A, 60A, 61A, 62C, 63A, 64A, 65A, 66C, 67A, 68A, 69 ^a	Puyo	Pastaza
70A, 71C, 72A, 73A, 74C	Colimes	Guayas
75C, 76A, 77A, 78C, 79 ^a	El Carmen	Carchi
80A, 81C, 82A, 83A, 84C	Los Bancos	Pichincha
85A, 86A, 87, 88A, 89C	Sta. Cruz A	Galápagos
90A, 91C	Machachi	Pichincha
92 ^a	Machachi	Pichincha
93 ^a	Puembo	Pichincha
94A, 95A, 96 ^a	Carchi	Carchi
97A, 98A, 99A, 100A, 101A, 102 ^a	Imbabura	Imbabura

Tabla 2. Datos de muestras colectadas fuera del territorio ecuatoriano.

Muestra #	Locación	País	Tratamiento
401A, 402A, 403 ^a	Tumbes	Perú	Ultrapasteurizada, UHT, N/A
404 ^a	Prov. Bs.As.	Argentina	Pasterurizada
405A, 406 ^a	Rumichaca	Colombia	UHT, UHT
407A, 408 ^a	Rumichaca	Colombia	Crema Cruda

Tabla 3. Reactivos utilizados en la reacción de amplificación para el Ensayo ADNr 16S mediante el kit Roche LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I.

Componente	Volúmen(uL)/rxn
H ₂ O _{PCR}	4.5
PCR Primer Mix 10X	1
Master Mix 5X	2
Volúmen Total	7.5
ADN	2.5
<i>Volúmen Reacción</i>	<i>10</i>

Tabla 4. Reactivos utilizados en la reacción de detección de la región IS111 de *Coxiella burnetii* mediante el kit ABI TaqMan Universal.

Componente	Volúmen(uL)/rxn
H ₂ O _{PCR}	2.7
MM w/ROX	5
Primer-F	0.8
Primer-R	0.4
Sonda 6-FAM	0.1
Volúmen Total	9
ADN	1
<i>Volúmen Reacción</i>	<i>10</i>

Tabla 5. Resultados de amplificación del ADNr 16S, obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1.

Pos	Name	Type	Call Target	CP
1	13A	Unknown	Positive	25,62
2	14A	Unknown	Positive	22,48
3	15A	Unknown	Positive	14,45
4	16A	Unknown	Positive	14,70
5	17A	Unknown	Positive	14,83
6	18A	Unknown	Positive	16,51
7	19A	Unknown	Positive	20,93
8	21C	Unknown	Positive	12,57
9	22A	Unknown	Positive	14,57
10	23A	Unknown	Positive	23,56
11	24A	Unknown	Positive	15,65
12	25B	Unknown	Positive	23,56
13	26A	Unknown	Positive	23,12
14	27A	Unknown	Positive	25,10
15	28A	Unknown	Positive	16,24
16	29A	Unknown	Positive	17,68
17	31A	Unknown	Positive	21,08
18	POS	Unknown	Positive	11,34

Muestras positivas de acuerdo a la detección cualitativa de la curva de amplificación. La columna rotulada "Name" indica el número de la muestra analizada, la columna rotulada "Call Target" indica el resultado de cada muestra.

Tabla 6. Resultados de amplificación del ADNr 16S. Tabla obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1.

Pos	Name	Type	Call Target	CP
1	32A	Unknown	Positive	21,80
2	33A	Unknown	Positive	25,61
3	35A	Unknown	Positive	26,42
4	37A	Unknown	Negative	
5	38A	Unknown	Positive	21,72
6	39A	Unknown	Positive	21,49
7	40B	Unknown	Positive	21,75
8	63A	Unknown	Positive	9,85
9	64A	Unknown	Positive	11,75
10	65A	Unknown	Positive	9,29
11	67A	Unknown	Positive	9,89
12	68A	Unknown	Positive	10,83
13	69A	Unknown	Positive	15,34
14	70A	Unknown	Positive	25,20
15	72A	Unknown	Positive	26,80
16	73A	Unknown	Positive	26,88
17	80A	Unknown	Positive	17,31
18	82A	Unknown	Positive	19,42
19	83A	Unknown	Positive	19,91
20	85A	Unknown	Positive	22,23
21	86A	Unknown	Positive	21,03
22	88A	Unknown	Positive	22,06
23	90A	Unknown	Positive	22,33
24	92A	Unknown	Positive	11,20
25	93A	Unknown	Positive	14,72
26	94A	Unknown	Positive	13,01
27	95A	Unknown	Positive	13,16
28	96A	Unknown	Positive	21,29
29	97A	Unknown	Positive	19,42
30	98A	Unknown	Positive	20,08
31	99A	Unknown	Positive	21,25
32	POS	Unknown	Positive	22,63

Muestras positivas de acuerdo a la detección cualitativa de la curva de amplificación. La columna rotulada "Name" indica el número de la muestra analizada, la columna rotulada "Call Target" indica el resultado de cada muestra.

Tabla 7. Resultados de amplificación del ADNr 16S. Tabla obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1.

Pos	Name	Type	Call Target	CP
1	41A	Unknown	Positive	16,55
2	44A	Unknown	Positive	28,62
3	45A	Unknown	Positive	27,53
4	46A	Unknown	Positive	29,11
5	48A	Unknown	Positive	19,48
6	49A	Unknown	Positive	25,06
7	50A	Unknown	Positive	27,24
8	51A	Unknown	Positive	25,14
9	POS	Unknown	Positive	10,73
10	NEG	Unknown	Positive	28,82

Muestras positivas de acuerdo a la detección cualitativa de la curva de amplificación. La columna rotulada “Name” indica el número de la muestra analizada, la columna rotulada “Call Target” indica el resultado de cada muestra.

Tabla 8. Resultados de amplificación del ADNr 16S. Tabla obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1.

Pos	Name	Type	Call Target	CP
1	76A	Unknown	Positive	25,11
2	77A	Unknown	Positive	25,46
3	79A	Unknown	Positive	25,51
4	POS	Unknown	Positive	11,19
5	NEG	Unknown	Positive	28,57

Muestras positivas de acuerdo a la detección cualitativa de la curva de amplificación. La columna rotulada “Name” indica el número de la muestra analizada, la columna rotulada “Call Target” indica el resultado de cada muestra.

Tabla 9. Resultados de amplificación del ADNr 16S. Tabla obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1.

Pos	Name	Type	Call Target	R CP
1	52A	Unknown	Positive	25,67
2	54A	Unknown	Positive	21,41
3	56A	Unknown	Positive	20,94
4	57A	Unknown	Positive	11,56
5	58A	Unknown	Positive	10,50
6	59A	Unknown	Positive	15,08
7	60A	Unknown	Positive	9,60
8	61A	Unknown	Positive	11,99
9	POS	Unknown	Positive	11,13
10	NEG	Unknown	Positive	30,59

Muestras positivas de acuerdo a la detección cualitativa de la curva de amplificación. La columna rotulada "Name" indica el número de la muestra analizada, la columna rotulada "Call Target" indica el resultado de cada muestra.

Tabla 10. Resultados de amplificación del ADNr 16S. Tabla obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1.

Pos	Name	Type	Call Target	R CP
1	1B	Unknown	Positive	26,00
2	2A	Unknown	Positive	25,21
3	3A	Unknown	Positive	25,43
4	4B	Unknown	Positive	25,53
5	6A	Unknown	Positive	26,93
6	7B	Unknown	Positive	26,07
7	9A	Unknown	Positive	26,16
8	10A	Unknown	Positive	27,12
9	11A	Unknown	Positive	27,17
10	12A	Unknown	Positive	27,44
11	100A	Unknown	Positive	15,53
12	101A	Unknown	Positive	16,14
13	102A	Unknown	Positive	19,81
14	405A	Unknown	Positive	15,57
15	406A	Unknown	Positive	18,57
16	407A	Unknown	Positive	20,75
17	408A	Unknown	Positive	18,91
18	33B	Unknown	Positive	24,94
19	37B	Unknown	Positive	21,29
20	POS	Unknown	Positive	11,19

Muestras positivas de acuerdo a la detección cualitativa de la curva de amplificación. La columna rotulada "Name" indica el número de la muestra analizada, la columna rotulada "Call Target" indica el resultado de cada muestra.

Tabla 11. Resultados de amplificación del ADNr 16S. Tabla obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1.

Pos	Name	Type	Call Target	R CP
1	5C	Unknown	Positive	25,54
2	8C	Unknown	Positive	30,10
3	20C	Unknown	Positive	12,07
4	30C	Unknown	Positive	20,30
5	34C	Unknown	Positive	24,72
6	36C	Unknown	Positive	27,18
7	42C	Unknown	Positive	24,58
8	43C	Unknown	Positive	27,48
9	47C	Unknown	Positive	24,20
10	53C	Unknown	Positive	19,58
11	55C	Unknown	Positive	22,76
12	62C (POS)	Unknown	Positive	10,71
13	66C	Unknown	Positive	10,14
14	71C	Unknown	Positive	28,66
15	74C	Unknown	Positive	26,61
16	75C	Unknown	Positive	23,20
17	78C	Unknown	Positive	23,42
18	81C	Unknown	Positive	17,14
19	84C	Unknown	Positive	12,84
20	89C	Unknown	Positive	19,01
21	91C	Unknown	Positive	28,11
22	401C	Unknown	Positive	25,60
23	402C	Unknown	Positive	25,13
24	403C	Unknown	Positive	24,61
25	404C	Unknown	Positive	25,28

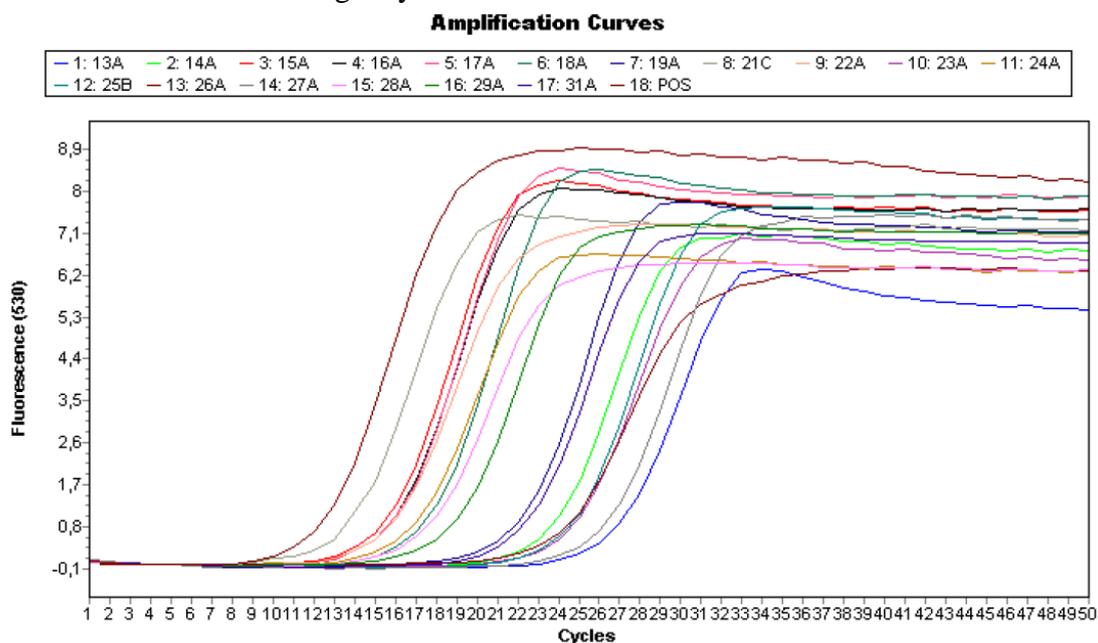
Muestras positivas de acuerdo a la detección cualitativa de la curva de amplificación. La columna rotulada "Name" indica el número de la muestra analizada, la columna rotulada "Call Target" indica el resultado de cada muestra.

Tabla 12. Resultados del Ensayo IS1111. Muestras positivas para la detección cualitativa de la curva de amplificación.

Muestra	Ct Ecuador	Ct Arizona	Locación	Tratamiento	Colecta
53C	36.62	36.36	Chambo, Chimborazo	Cruda	Pool
54A	32.73	N/A	Chambo, Chimborazo	Cruda	Pool
55C	37.10	36.15	Chambo, Chimborazo	Cruda	Pool
62C	NEGATIVO	36.85	Puyo, Pastaza	Cruda	Individuo
401A	NEGATIVO	36.54	Perú	Ultrapasteurizada	Pool
402A	36.16	34.93	Perú	UHT	Pool
403A	36.10	35.25	Perú	N/A	Pool
404A	NEGATIVO	32.38	Argentina	Pasteurizada	Pool
407A	37.32	N/A	Rumichaca, Colombia	Cruda	Pool

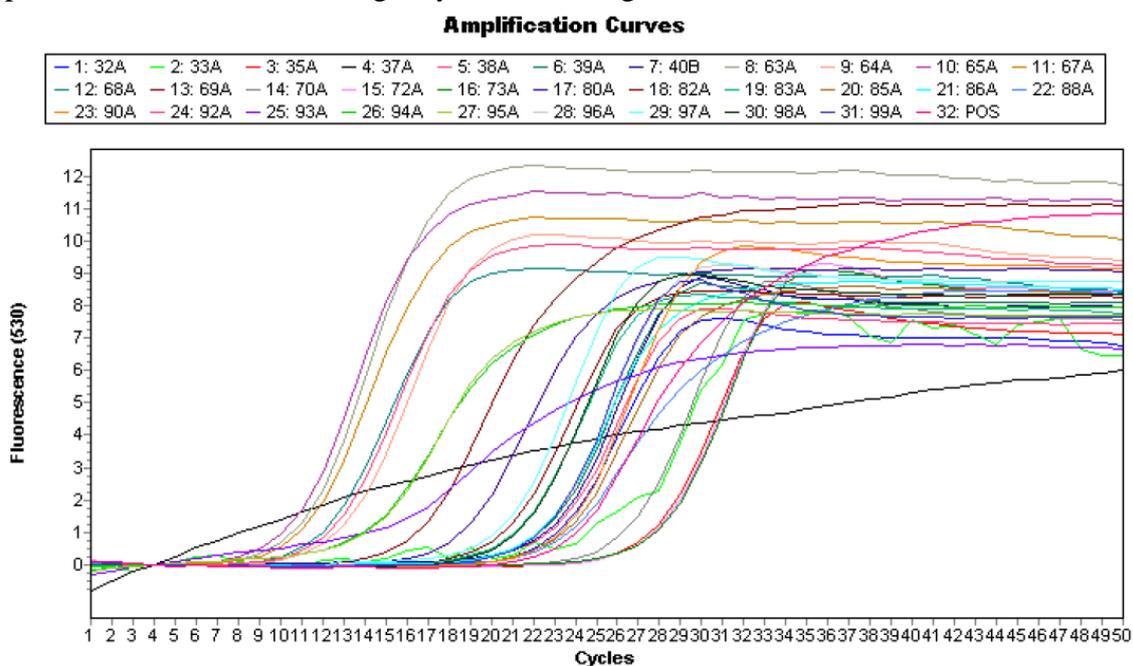
12. Figuras

Figura 1. Curva de amplificación para la detección cualitativa del ADNr 16S, obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1. Primer set de muestras.



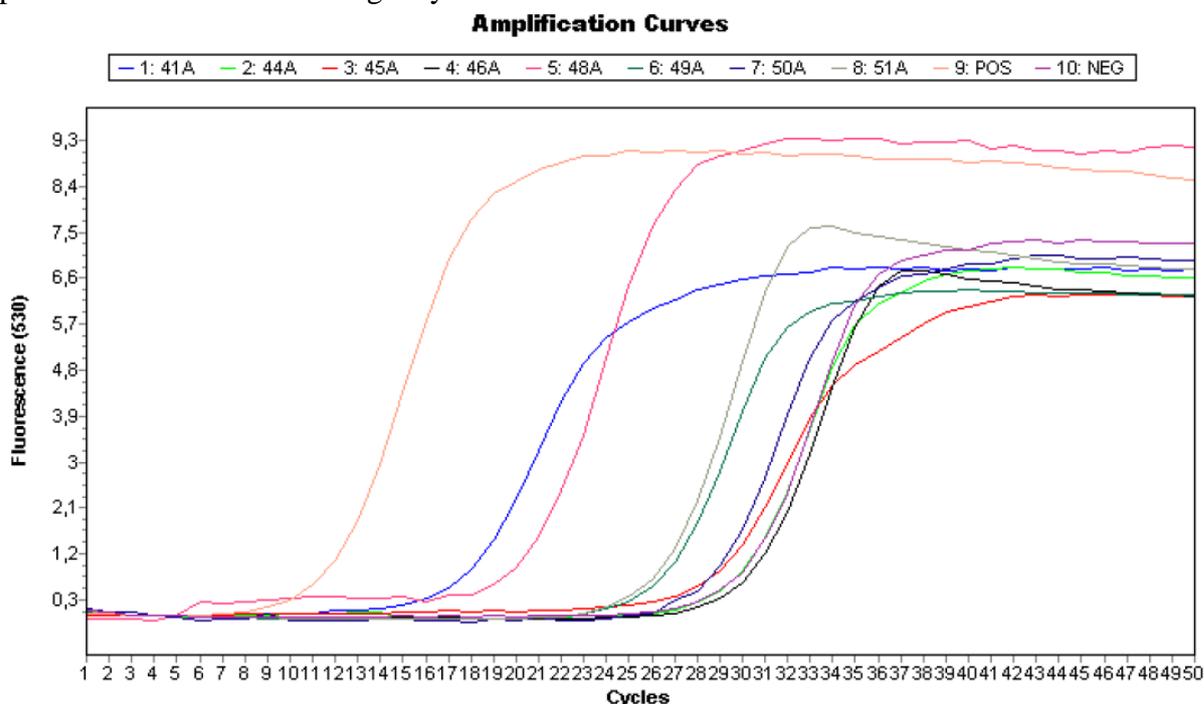
Las curvas evidencian la fase exponencial de amplificación en la cual el aparato ha detectado la fluorescencia emitida por el SYBR al intercalarse a la doble cadena del ADN blanco, lo que las determina como positivas. El recuadro superior especifica el número correspondiente a cada curva.

Figura 2. Curva de amplificación para la detección cualitativa del ADNr 16S, obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1. Segundo set de muestras.



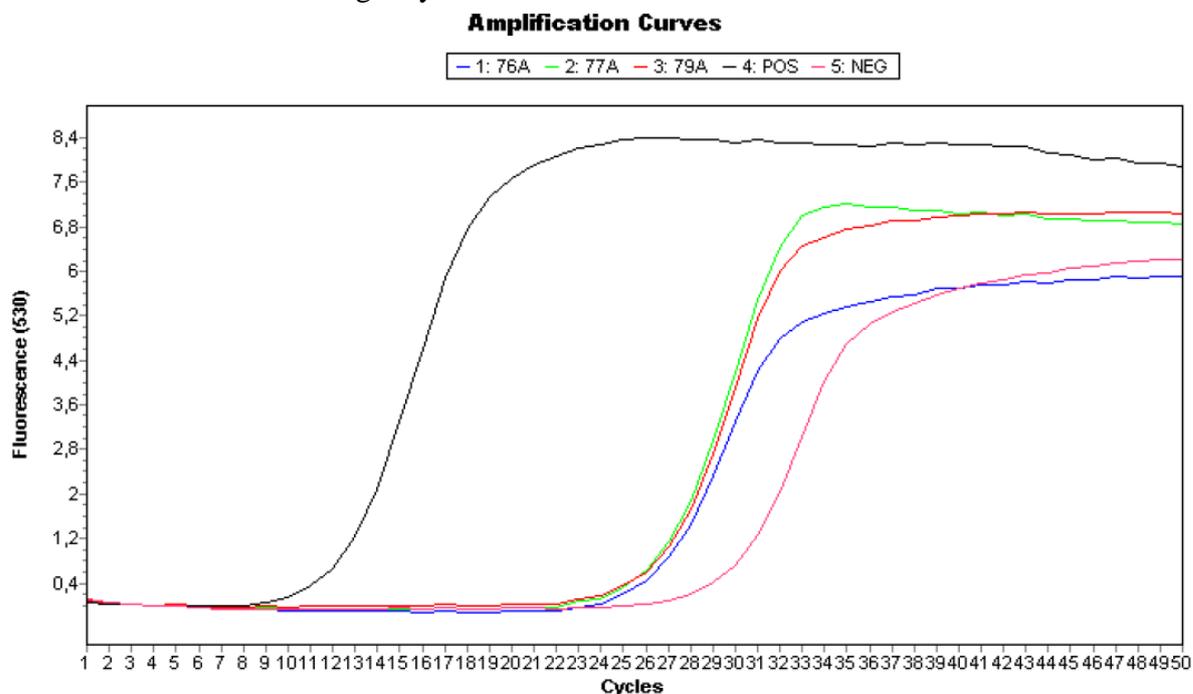
Las curvas evidencian la fase exponencial de amplificación en la cual el aparato ha detectado la fluorescencia emitida por el SYBR al intercalarse a la doble cadena del ADN blanco, lo que las determina como positivas. El recuadro superior especifica el número correspondiente a cada curva.

Figura 3. Curva de amplificación para la detección cualitativa del ADNr 16S, obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1. Tercer set de muestras.



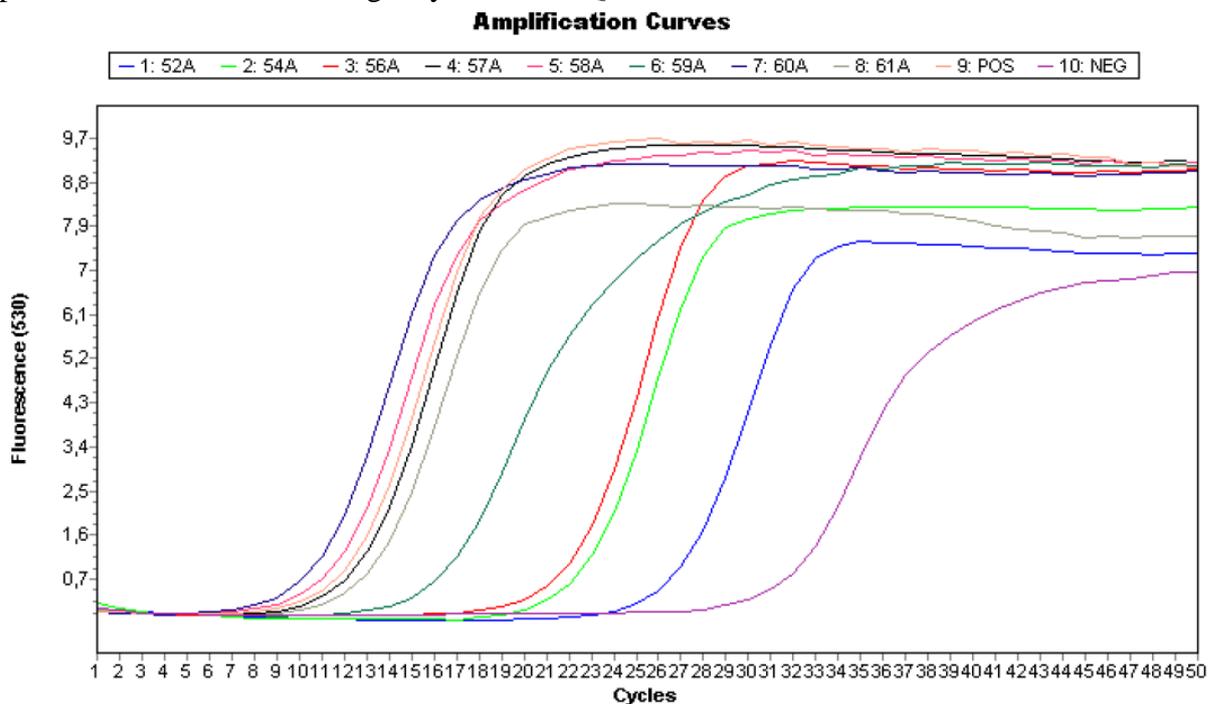
Las curvas evidencian la fase exponencial de amplificación en la cual el aparato ha detectado la fluorescencia emitida por el SYBR al intercalarse a la doble cadena del ADN blanco, lo que las determina como positivas. El recuadro superior especifica el número correspondiente a cada curva.

Figura 4. Curva de amplificación para la detección cualitativa del ADNr 16S, obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1. Cuarto set de muestras.



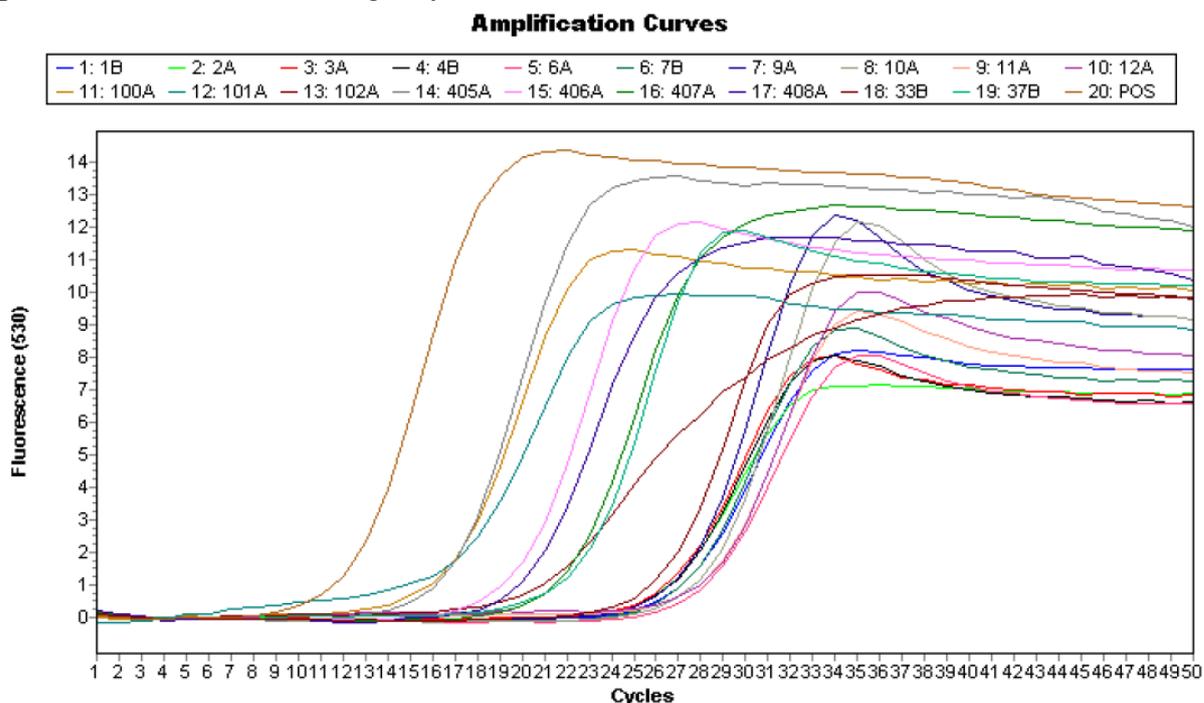
Las curvas evidencian la fase exponencial de amplificación en la cual el aparato ha detectado la fluorescencia emitida por el SYBR al intercalarse a la doble cadena del ADN blanco, lo que las determina como positivas. El recuadro superior especifica el número correspondiente a cada curva.

Figura 5. Curva de amplificación para la detección cualitativa del ADNr 16S, obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1. Quinto set de muestras.



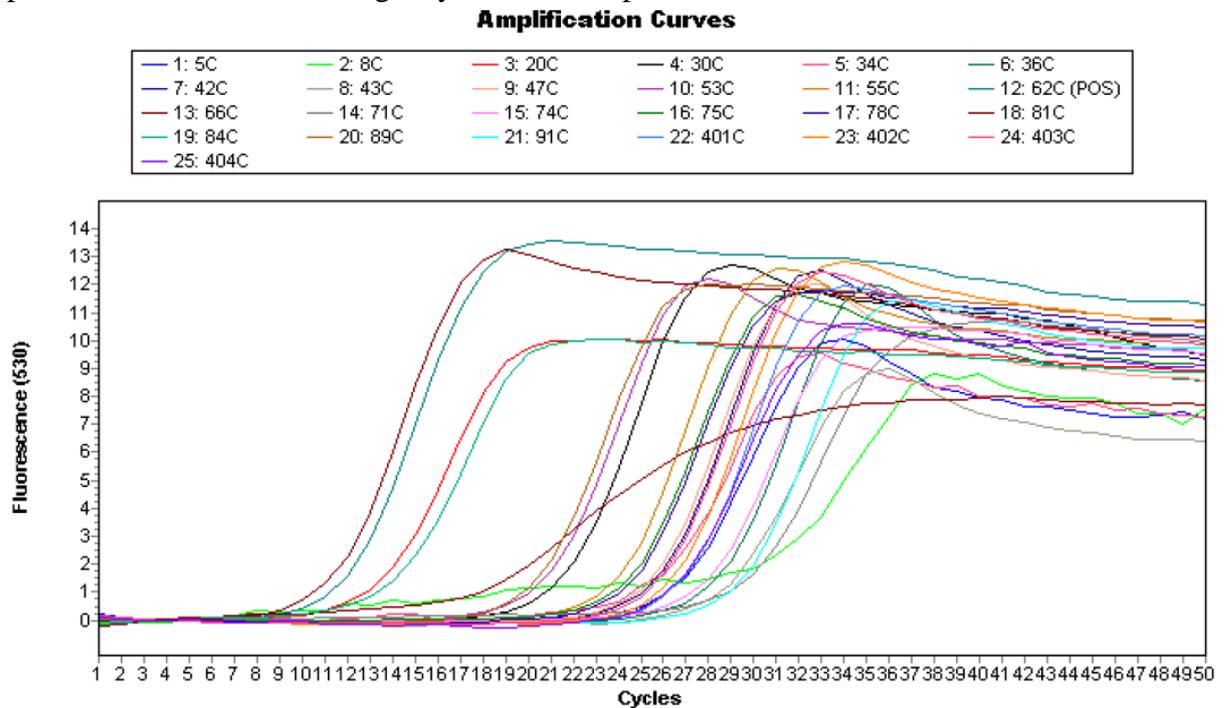
Las curvas evidencian la fase exponencial de amplificación en la cual el aparato ha detectado la fluorescencia emitida por el SYBR al intercalarse a la doble cadena del ADN blanco, lo que las determina como positivas. El recuadro superior especifica el número correspondiente a cada curva.

Figura 6. Curva de amplificación para la detección cualitativa del ADNr 16S, obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1. Sexto set de muestras.



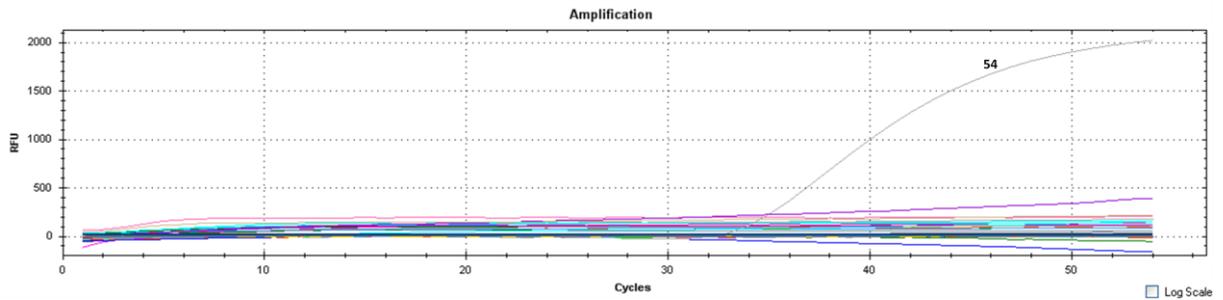
Las curvas evidencian la fase exponencial de amplificación en la cual el aparato ha detectado la fluorescencia emitida por el SYBR al intercalarse a la doble cadena del ADN blanco, lo que las determina como positivas. El recuadro superior especifica el número correspondiente a cada curva.

Figura 7. Curva de amplificación para la detección cualitativa del ADNr 16S, obtenida a partir del Software Roche LightCycler® 4.1. Séptimo set de muestras.



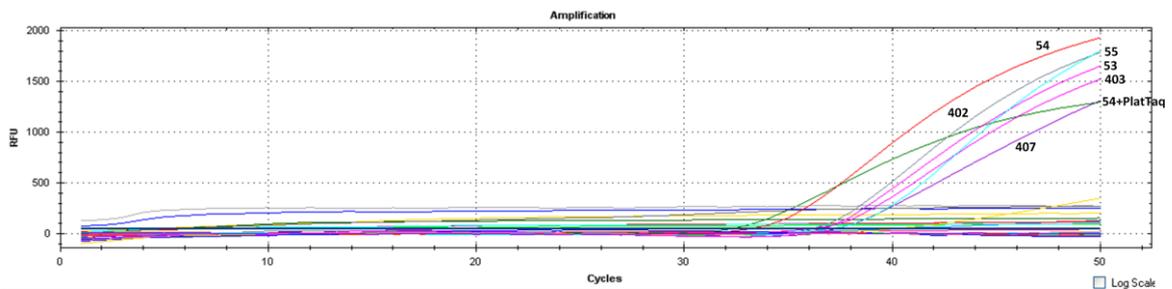
Las curvas evidencian la fase exponencial de amplificación en la cual el aparato ha detectado la fluorescencia emitida por el SYBR al intercalarse a la doble cadena del ADN blanco, lo que las determina como positivas. El recuadro superior especifica el número correspondiente a cada curva.

Figura 8. Curva de amplificación para la detección cualitativa de la región IS111 de *Coxiella burnetii*, obtenida a partir del Software Bio-Rad CFX™ Manager 1.6.



Muestras 1-59: La curva evidencia el ciclo en el cual la fluorescencia emitida por el fluoróforo FAM presente en la sonda, específica para el ADN blanco, ha superado aquella del umbral.

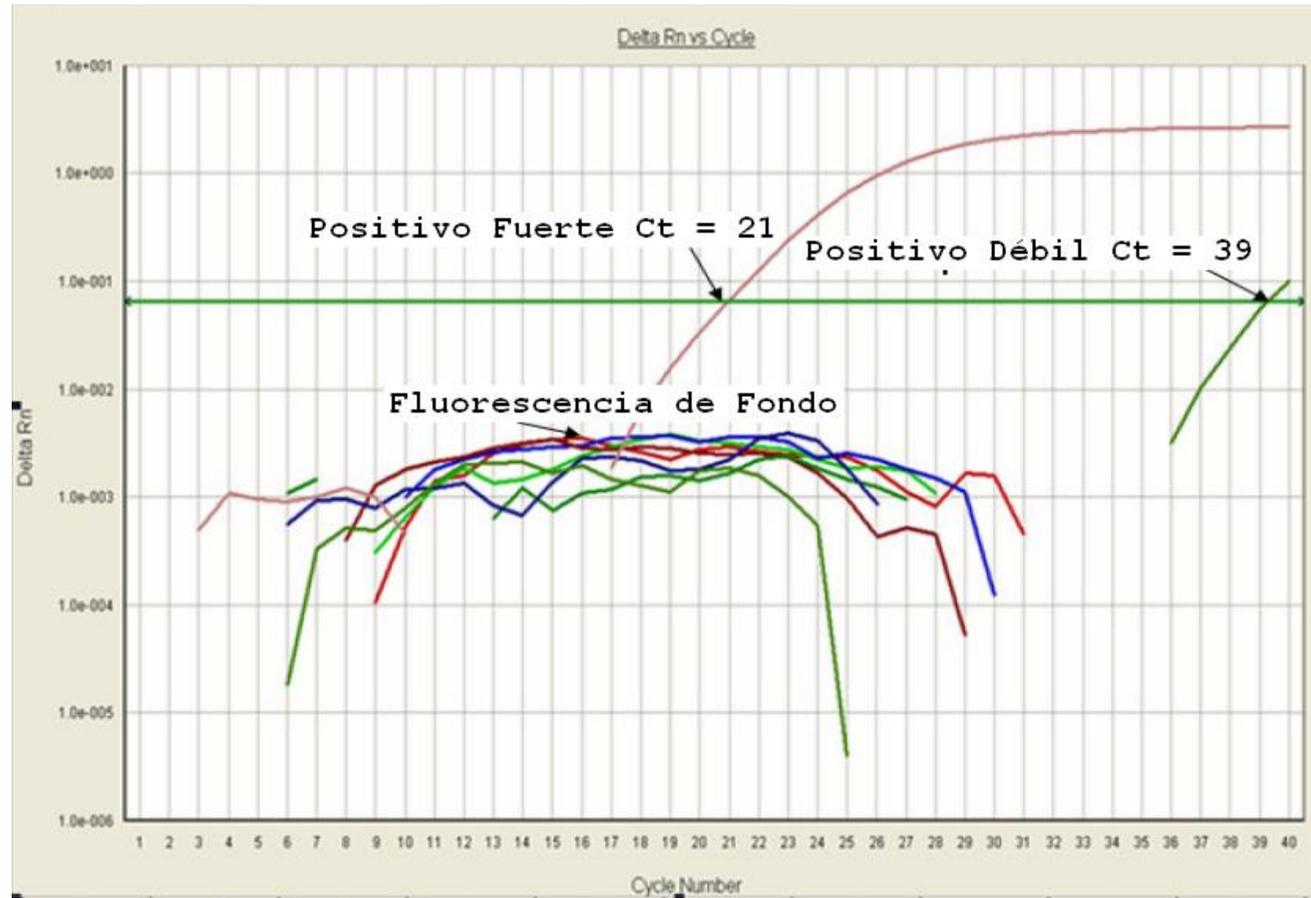
Figura 9. Curva de amplificación para la detección cualitativa de la región IS111 de *Coxiella burnetii*, obtenida a partir del Software Bio-Rad CFX™ Manager 1.6.



Muestras 60-408: Las curvas evidencian los respectivos ciclos en los cuales la fluorescencia emitida por el fluoróforo FAM presente en la sonda, específica para el ADN blanco, ha superado aquella del umbral.

13. Anexos.

13.2. Anexo 2



13.2. Anexo 2

```

1 gtagcccaat gaaatggacc cacccttaa agacggcgtc ataatgcgcc aacatagaat
61 ttctatthtc aaaaaaagga gaaggtccat gaaagatatt aaaatactgg gtggtgatat
121 tgcaaaagat gtttttcaac tgtgtggaat tgatgagtgg ggtaaagtga tctacacgag
181 acgggttaag cgtgctcagt atgtatccac cgtagccagt cttaaaggtgg gctgcgtggt
241 gatggaagcg tgtggaggag cgaaccattg gtatcggacg tttatgggga tgggtatccc
301 aacgcagttg atcagtccgc agcacgtcaa accgtatgtc aaaagtaaca agaatgatcg
361 taacgatgcy caggcgatag ctgaagcggc ttcccgcgcc tcgatgcggt ttgtgcaggg
421 taaaacggtg gaacaacaag acgttcaagc gctgttaaag atacgcgatc gtttagtcaa
481 aagccgcacg gcgctgatca atgagattcg ggggttggtg caagaatacg gactcacgat
541 ggcgcgtggt gccaagcgat tttatgaaga gctcccgttg attttagcga gcgaagcggg
601 gggattaaca ccgcgatga aacgggtggt gaattggttg tataccgaat tgttgaaccg
661 ggacgaagcg attggtgatt acgaggagga attaaaagcg gtggcaaaag ccaatgagga
721 ttgtcaacgg gtacagagca tcccgggggt gggttattta acggcgctct cggtttatgc
781 gagcgtgggt gacattcatc aatttcatcg ttcccggcag ttgtcggcgt ttattgggtt
841 ggtccctcga caacattcga gtgggaataa ggaggtggtg ttggggatta gtaaaccgcy
901 caatgtgatg ttaaggacgt tattgattca tggcgcccgt gcgctattgc gtcagtataa
961 aaataaaacg gataaaaaga gtctgtgggt aaaagcactc attgagcgcg gcggaatgaa
1021 tcgcycttgt gtggcgttag cgaataaaaa tgcgcgcatc atttggggcg ttttaacacg
1081 ccaagaaacg tategtgtg gcgctaacc accgcytggt gtaaaaaaaaa gaattaacaa
1141 aaggagacac accaaccgag ttcgaaacaa tgagggctga tgaaagtaag gtaaacctg
1201 aggttgatta agctgattca tacggtggct ctgtgaagcc gatagcccga taagcatcaa
1261 cttgcataa ttcattcaag caccaatggt ggccaattta aatcgtgatg ccgatatac
1321 gaatgcaacc gctttctttt catcaaaact gattgttgac aacaaggggt ggtccatata
1381 cgtatgcacg aagcggataa cgaggatgaa atcattttct ccgtattccg cttcgtgca
1441 tacgggctac //

```

Secuencia del gen de la transposasa (IS1111a) de *Coxiella burnetii*, obtenida a partir del GenBank, acceso #M80806.1.

A color, secuencias de annealing: Primer forward (azul), sonda TaqMan (rojo), primer reverse (verde).