

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias de la Salud

**Estudio de *Leptospira* patogénica en saladeros de la Estación de
Biodiversidad Tiputini (EBT)**

Daniela Abigail Andrade Gordon

Medicina Veterinaria

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de Medicina Veterinaria

Quito, 15 de mayo de 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias de la Salud

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Estudio de *Leptospira* patogénica en saladeros de la Estación de
Biodiversidad Tiputini (EBT)**

Daniela Abigail Andrade Gordon

Lenin Vinueza DMVZ, MSc. PhD
Nombre del profesor, Título académico

Quito, 15 de mayo de 2024

© 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: Daniela Abigail Andrade Gordon

Código: 00212383

Cédula de identidad: 1719290098

Lugar y fecha: Quito, 15 de mes de año

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UNPUBLISHED DOCUMENT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>.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a Eduardo Díaz, mi director de monografía, por su apoyo incondicional y por brindarme la oportunidad de llevar a cabo esta investigación.

Al personal de la Estación de Biodiversidad Tiputini por la ayuda en la logística de la toma de muestras y el permitirme estudiar sobre esto.

También quiero expresar mi gratitud al Instituto de Microbiología por permitirme realizar los análisis en su laboratorio y abrirme las puertas del instituto.

Un agradecimiento especial al grupo de Genómica del Instituto de Microbiología y, en particular, a Vero Barragán, quien me orientó y brindó su ayuda durante todo el proceso de mi monografía.

Estoy muy agradecido por el respaldo y la colaboración recibidos de todos los miembros del grupo de laboratorio en especial a Diego Guzmán y Pamela Mosquera por ser un pilar importante para la finalización de mi monografía.

RESUMEN

La leptospirosis, una zoonosis ampliamente distribuida a nivel mundial, representa un desafío significativo para Ecuador al ser una enfermedad desatendida. Las temperaturas y precipitaciones características de los climas tropicales son factores que favorecen la presencia y supervivencia de la *leptospira* en el ambiente. La bacteria se transmite principalmente a través de la orina de mamíferos infectados que actúan como reservorios del patógeno. Los saladeros son zonas en las que convergen una diversidad de especies de fauna silvestre con el objetivo de obtener minerales, por lo que podrían ser fuentes importantes para la diseminación y contagio de la bacteria.

En este estudio, se recolectaron muestras de suelo de cuatro saladeros aledaños a las Estación Biodiversidad Tiputini en el Parque Nacional Yasuní, Ecuador. El ADN obtenido fue analizado mediante 2 ensayos de qPCR (lipL32 y SNP111) para la detección de *leptospiras* patogénicas. Los resultados fueron negativos en ambos ensayos.

Sin embargo, la presencia de la bacteria no es descartada en este estudio debido a que varios estudios han evidenciado la presencia de *Leptospira* spp. en la fauna silvestre de los saladeros. Por lo tanto, se discuten diversos factores que podrían haber causado la inhibición o degradación del ADN en las muestras, tales como la presencia de ácidos húmicos u otros materiales orgánicos y el tipo de conservante utilizado durante el almacenamiento de las muestras.

Palabras Clave: *Leptospira, Saladeros, Fauna Silvestre, Molecular, Inhibición*

ABSTRACT

Leptospirosis, a widely distributed zoonosis worldwide, represents a significant challenge for Ecuador as a neglected disease. The temperatures and precipitation characteristic of tropical climates are factors that favor the presence and survival of *leptospira* in the environment. The bacteria are mainly transmitted through the urine of infected mammals that act as reservoirs of the pathogen. Salt licks are areas where a diversity of wildlife species converge to obtain minerals, and therefore, they could be important sources for the dissemination and contagion of the bacteria.

In this study, soil samples were collected from four salt licks near to the Tiputini Biodiversity Station in Yasuní National Park, Ecuador. The DNA obtained was analyzed using two qPCR assays (lipL32 and SNP111) for the detection of pathogenic *leptospires*. The results were negative in both assays.

However, the presence of the bacteria is not dismissed in this study because several studies have shown the presence of *Leptospira* spp. in the wildlife of salt licks. Therefore, various factors that could have caused inhibition or degradation of DNA in the samples are discussed, such as the presence of humic acids or other organic materials and the type of preservative used during sample storage.

Key Words: *Leptospira, Salt licks, Wildlife, Molecular, Inhibition*

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
ÍNDICE DE FIGURAS	9
INTRODUCCIÓN	10
ANTECEDENTES / SITUACIÓN ACTUAL	12
JUSTIFICACIÓN	13
FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	13
HIPÓTESIS:	13
OBJETIVOS	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	14
MATERIALES & METODOLOGÍA	14
MATERIALES	14
RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.....	15
EXTRACCIÓN DE ADN	16
AMPLIFICACIÓN DEL GEN 16S PCR CONVENCIONAL	17
IDENTIFICACIÓN DE <i>LEPTOSPIRA</i> PATOGENICA POR QPCR	18
RESULTADOS	20
DISCUSIÓN	22
REFERENCIAS	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa geográfico mostrando la ubicación de los sitios de muestreo. Ebt (triángulo verde), saladeros (puntos amarillos)	15
Figura 2. Protocolo de extracción de adn con kit mo bio	17
Figura 3. Resultados de la pcr convencional del gen 16s	20
Figura 4. Análisis de pcr en tiempo real del gen lip132 del adn extraído de las 20 muestras de saladeros., controles positivos (curva en verde) - muestras (curva azul).....	21
Figura 5. Análisis de pcr en tiempo real del gen snp 111 del adn extraído de las 20 muestras de saladeros., controles positivos (curva en verde) - muestras (curva azul).....	21

Introducción

La *Leptospira* spp, es una bacteria gran-negativa del orden Espiroquetales, son delgadas y helicoidales con una alta diversidad genética (Miller et al., 2021). De las 69 especies de *Leptospira* descritas en 2022, ocho se consideran altamente virulentas y están asociadas con infecciones en humanos y animales, mientras que las 61 especies restantes se encuentran en fuentes ambientales (Davignon et al., 2023). Se dividen en tres linajes filogenéticos según su grado de virulencia: saprofitas, intermedias y patógenas. Las de especie patógenas e intermedias comparten un ancestro común por lo cual tiene un nivel de virulencia moderado a severo, a diferencia de las saprofitas que se encuentran en el ambiente y no son virulentas (Soo et al., 2020). Las leptospiras son bacterias aerobias obligadas (requieren de oxígeno) y son mesófilos (temperatura óptima de crecimiento va de 28 a 30° C). Es por ello que los climas cálidos, húmedos con altas precipitaciones y pH neutro a alcalino se asocia con presencia de esta bacteria y favorece a su supervivencia en el ambiente (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010).

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana zoonótica, donde los mamíferos, principalmente los roedores, actúan como reservorios de *Leptospira*. Esta bacteria se aloja en los túbulos renales de los mamíferos, donde está protegida de los cambios de temperatura, pH y otros factores ambientales. Se excreta a través de la orina y contamina suelos, agua y alimentos, manteniendo así su ciclo de vida. El contacto directo con la bacteria puede ocurrir a través de laceraciones o heridas en la piel. En entornos urbanos, como los asentamientos informales con alta densidad de población de roedores, se favorece la transmisión del patógeno. En este escenario, los humanos se convierten en huéspedes incidentales,

aumentando el riesgo de infección (Davignon et al., 2023). Los signos clínicos de la enfermedad son altamente variables y pueden oscilar entre leves y graves. Los individuos infectados, tanto humanos como animales, pueden manifestar síntomas como fiebre, letargia, ictericia, así como disfunciones renales y hepáticas (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010).

Se ha detectado la presencia de *Leptospira* en ríos y suelos adyacentes, lo que suscita la sospecha de que estos entornos representan una importante fuente de transmisión. A partir de lo expuesto, se postula que los ríos podrían constituir un ambiente propicio para sobrevivir a esta bacteria. Sin embargo, aún no se dispone de certeza acerca de la capacidad de multiplicación de la *Leptospira* patógena en el medio ambiente (Miller et al., 2021). No obstante, existe evidencia sobre la supervivencia y persistencia de la bacteria en el medio ambiente. Investigaciones recientes han revelado una mayor tasa de aislamiento en muestras de suelo en comparación con muestras de agua, lo que sugiere la posibilidad de que los suelos actúen como el hábitat original de la *Leptospira* y como portadores significativos de cepas patógenas (Bierque et al., 2020).

Los saladeros son localizaciones específicas donde convergen diversas especies de mamíferos. Los saladeros húmedos se encuentran asociados a afloramientos de aguas subterráneas, caracterizándose por áreas desprovistas de vegetación arbórea y con presencia de lodo, mientras que los saladeros secos se sitúan a lo largo de arroyos o cauces de ríos, donde se forman depósitos de elementos solubles que pueden provocar erosión (Ayotte et al., 2008). Los animales que frecuentan estos entornos exhiben comportamientos de geofagia, que consisten en la ingesta de tierra, arcilla o sedimentos presentes en los saladeros. Este comportamiento es observado principalmente en mamíferos de dieta herbívora. Los saladeros suelen tener elevadas concentraciones de minerales, tales como sodio, potasio, calcio, magnesio y azufre. Por consiguiente, una de las razones acerca de la geofagia es la compensación de la deficiencia mineral en la dieta, específicamente la demanda de sodio para

mantener la homeostasis mineral. Además, se ha sugerido que la arcilla presente en estos sitios puede contribuir a mitigar problemas digestivos, bacterianos y la ingesta de compuestos tóxicos. Sin embargo, esto puede aumentar factores como contagio de enfermedades y el aumento de la depredación (Best et al., 2013).

Antecedentes / Situación Actual

En América Latina, un total de 79 estudios científicos han investigado la presencia de *Leptospira* en la fauna silvestre. Dentro de la clase de mamíferos, los órdenes *Carnívora*, *Rodentia*, *Primates* y *Artiodactylia* han mostrado ser portadores de esta bacteria. Es importante destacar que, los reservorios más frecuentes de esta enfermedad se encuentran entre los carnívoros, que habitan áreas inundadas y consumen presas infectadas. En particular, se observó que el orden *Mustelidae* presentó una positividad del 50% a *Leptospira* en estas condiciones (Vieira et al., 2018).

En los saladeros de la Estación de Biodiversidad Tiputini (EBT), Parque Nacional Yasuní (Ecuador) se ha realizado un estudio previo con cámaras trampa para saber cuáles especies de animales circulan estos sitios. Después de analizar 888 fotografías se concluyó que circulan más de 15 especies de aves como: Guacamayas, Halcones, Garzas, Pavas, entre otros y 23 especies de mamíferos no voladores como: zarigüeyas, tamandúas, perezosos, armadillos, tapires, primates y felinos, entre otros (Blake et al., 2011).

Con respecto a la presencia de *Leptospira* spp., en saladeros, hasta donde sabemos no se ha llevado a cabo ninguna investigación previa. No obstante, se han realizado estudios previos sobre la presencia de enterobacterias en saladeros de Malasia. Debido a que estos lugares son habituales para la fauna silvestre, podrían ser potenciales puntos de transmisión de patógenos bacterianos. Los resultados de este estudio indicaron una alta frecuencia de aislamiento de patógenos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* en muestras de suelo

y se detectó la presencia de *Escherichia coli* tanto en muestras de suelo como de agua, lo cual sugiere la presencia de bacterias patógenas (Lihan et al., 2022). Estos hallazgos proporcionan evidencia sobre la posible aparición de patógenos potenciales en este tipo de entornos, como por ejemplo la presencia de *Leptospira* spp. patogénica.

Justificación

La leptospirosis es una enfermedad desatendida y endémica en el Ecuador, su presencia se registra en una variedad de entornos, los cuales ofrecen condiciones óptimas para la supervivencia de esta bacteria (Calvopiña et al., 2023) Además, existe poca información sobre el ciclo de transmisión de la *Leptospira* en la vida silvestre y posiblemente los saladeros formen parte de este ciclo. La *Leptospira* es excretada a través de la orina de los animales infectados, lo que sugiere que los saladeros, debido a la presencia y hábitos de una diversidad de mamíferos, podrían ser sitios propicios para su proliferación y permanencia. El detectar *Leptospira* spp en estos sitios podría dar un indicio de un posible lugar de transmisión del patógeno la enfermedad y nos abrirá pasos a futuras investigaciones con la fauna silvestre de esa área.

Formulación del problema

¿Existe la presencia de *Leptospira* spp en saladeros de la EBT?

Hipótesis:

Considerando la detección previa de *Leptospira* en especies de animales mamíferos de la vida silvestre, que visitan los saladeros, es posible que los saladeros de la EBT podrían estar asociados con la presencia de *Leptospira* spp.

Objetivos

Objetivo General

Determinar la presencia de *Leptospira spp*, por medio de análisis molecular en las muestras de suelo de saladeros de la EBT.

Objetivos Específicos:

1. Aplicar técnicas de extracción de ADN, PCR convencional y qPCR para detectar la presencia/ausencia de *Leptospira* patógena en las muestras obtenidas de los saladeros
2. Identificar mediante revisión de literatura científica a las especies de mamíferos que frecuentan los saladeros y que podrían actuar como potenciales portadores de *Leptospira*.

Materiales & Metodología

Materiales

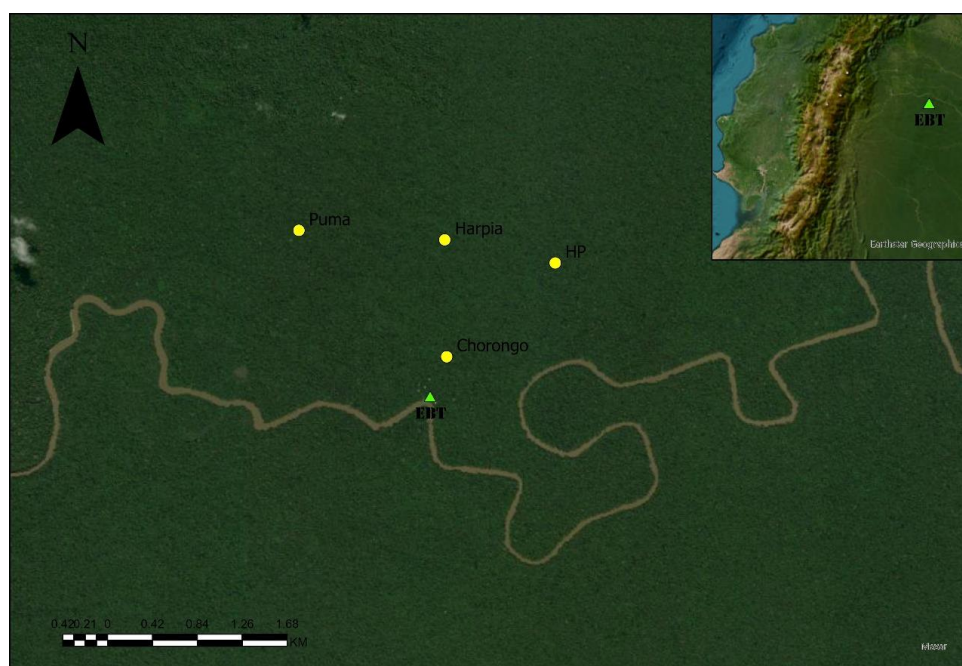
Para realizar la PCR se utilizan: micropipetas, puntas, tubos de reacción de 2ml, tubos eppendorf de 0.2ml, centrifuga, vortex, termociclador, agarosa, TBE 1x (Tris-Borato-EDTA), cámara electroforesis, fotodocumentador.

Para realizar las qPCR se necesita: tubo reacción de 2ml, tubos strip 0.2ml, termociclador en tiempo real (qPCR), pipetas y puntas.

Recolección de Muestras

El estudio se realizó en el Parque Nacional Yasuní, específicamente en saladeros aledaños a la EBT de la Universidad San Francisco de Quito. Se recolectaron 5 muestras de diferentes áreas del suelo de 4 saladeros, obteniendo un total de 20 muestras, cada saladero está identificado con un nombre y código de muestra: saladeros GP (Puma), saladeros CH (Chorongo), saladeros HI (HP), y saladero AN (Harpía) (Figura 1). Al momento de la recolección de muestras, para prevenir la degradación del ADN se agregó una cantidad de suelo en un tubo con 2 ml del preservante DNA/RNA Shield 1x. Las muestras fueron mantenidas en oscuridad a temperatura ambiente hasta su traslado al Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito, donde se mantuvieron a -4°C hasta la extracción del ADN.

Figura 1. Mapa geográfico mostrando la ubicación de los sitios de muestreo. EBT (triangulo verde), saladeros (puntos amarillos)



Extracción de ADN

La extracción del ADN de las 20 muestras recolectadas se realizó con el Kit de MO BIO's PowerSoil DNA Isolation (QIAGEN). El kit de MO BIO está diseñado para el uso exclusivo de muestras ambientales que contengan un alto contenido de ácido húmico como es el caso de la: composta, el sedimento o el estiércol. El ADN aislado tiene un alto nivel de pureza, por lo tanto, permite una mejor amplificación en PCR de la muestra.

El protocolo para la extracción de ADN (Figura 2) inicia con la adición de 0,25 gramos de muestra de suelo en un tubo PowerBead. Este tubo contiene perlas que facilitan la homogeneización y lisis celular, junto con un amortiguador que disuelve los ácidos húmicos y protege los ácidos nucleicos de la degradación. Luego, se agrega solución C1, que contiene SDS y otros agentes disruptores para la lisis celular, y se realiza una etapa de vortex para mezclar. Posteriormente, se lleva a cabo una etapa de vortex durante 10 minutos para asegurar la completa homogeneización y lisis celular. El sobrenadante se transfiere a un tubo de recolección limpio, y se añade solución C2 para eliminar inhibidores adicionales. Después de una breve incubación y centrifugación, se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo, al cual se le agrega solución C3 para una segunda eliminación de inhibidores. El sobrenadante se transfiere nuevamente a un nuevo tubo, al cual se le agrega solución C4 para precipitar el ADN. Este precipitado se recoge en un spin filter y se lava con solución C5 para eliminar contaminantes. Finalmente, se añade solución C6 al spin filter para que el ADN se libere de la membrana de sílice, se recoge en un tubo de recolección limpio después de la centrifugación.

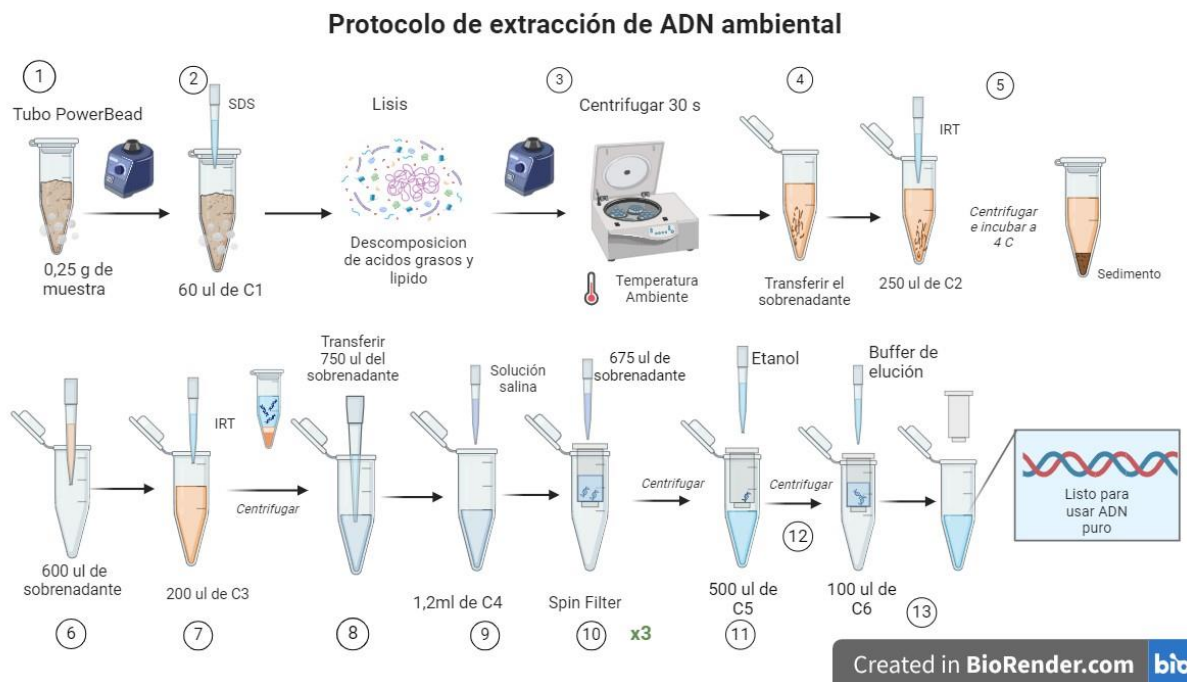


Figura 2. Protocolo de extracción de ADN con kit MO BIO

Amplificación del gen 16s PCR convencional

Para verificar la adecuada extracción del ADN y la presencia de inhibición ya sea por ácidos húmicos o cantidades altas de ADN, se realizó una PCR convencional amplificando el gen 16S rRNA. El ARN ribosómico 16S (16S rRNA) es una macromolécula ampliamente empleada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas debido a su presencia universal en las bacterias actuales (Rodicio & Mendoza, 2004). Este estudio de PCR se realizó para verificar la calidad de nuestra extracción y evaluar la presencia o ausencia de ADN en las muestras analizadas.

El procedimiento comienza con la preparación del master mix, que incluye los siguientes componentes: Primers 27F y 1492R (Miller et al., 2013b) 0.2 μ M cada uno, agua, buffer 1X, MgCl 1.5 mM, dNTPs 0.2 μ M y enzima Platinum II Taq Hot-Start DNA Polymerase 0.04 U/ μ L (Thermo Fisher, Invitrogen), en donde se va a obtener un volumen

final de 9 µl de master mix con 1 µl de ADN. . La amplificación del gen 16S rRNA se llevó a cabo con las siguientes condiciones: 94 °C durante 2 minutos para la desnaturalización inicial, 94 °C durante 30 segundos para la desnaturalización, 45 °C durante 1 minuto para la alineación de los cebadores, y seguido de 35 ciclos de amplificación que consisten en 72 °C durante 2 minutos para la extensión del fragmento de ADN. Finalmente, se realiza una extensión adicional a 72 °C durante 7 minutos para completar la síntesis del fragmento.

Después de la amplificación en el termociclador, se procede a la carga de muestras en un gel de agarosa previamente preparado a 1.2%, añadiendo 4 µl de ADN y 1 µl de "blue juice", una solución que incrementa la densidad y facilita la carga en los pocillos del gel. Posteriormente, las muestras se introducen en la cámara de electroforesis, donde se aplican corrientes eléctricas que inducen la migración de las moléculas a través del gel. La visualización del gel se lleva a cabo utilizando una foto documentador, en el cual se espera obtener un fragmento de 1450pb en todas las muestras analizadas.

Identificación de *Leptospira* patogénica por qPCR

Una vez confirmada la presencia de bacterias en las muestras de ADN mediante esta técnica, se procede con la identificación de *Leptospira* mediante qPCR (PCR cuantitativa en tiempo real). Este método se realizó usando dos ensayos, lipL32 y SNP 111 (16S rRNA), para la detección específica de leptospiros patogénicas. El gen *lipL32* codifica la lipoproteína lipL32 de este patógeno, la cual se considera un factor de virulencia presente (Stoddard et al., 2009). Por otro lado, el ensayo SNP 111 detecta tanto miembros patógenos como intermedias de *Leptospira* (Barragan et al., 2016). Ambos ensayos utilizan sondas con tecnología TaqMan diseñados específicamente para cada gen, los cuales amplifican la misma región de interés, pero las sondas se hibridan con objetivos distintos.

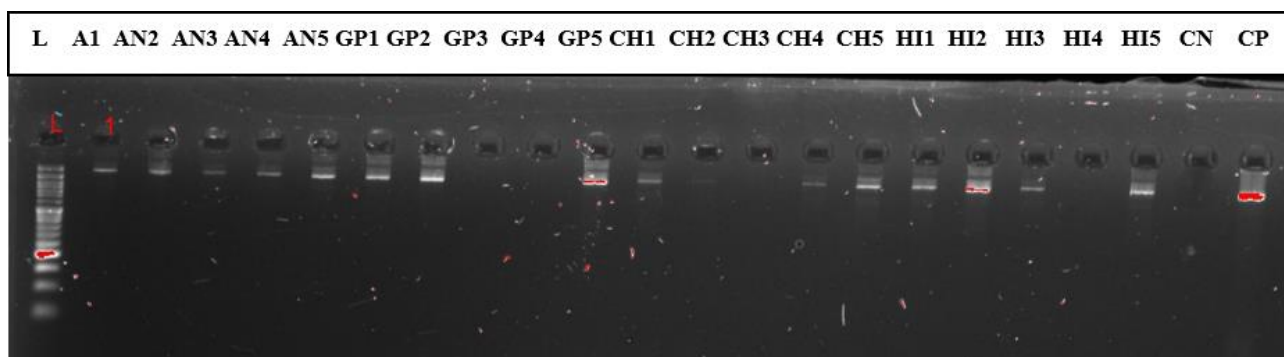
En la preparación del master mix para lipL32, se utilizó 1x de TaqMan® Genotyping Master Mix (Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, CA, USA), 0.4 μM de la sonda ProbeLip132, 0.9 μM de cada uno de los cebadores (LipL32-45F, LipL32-286R), y agua para alcanzar un volumen total de 9 μL , se agregó 1 μL de ADN a cada reacción. La amplificación se llevó a cabo por triplicado en un termociclador de tiempo real BioRad, siguiendo las siguientes condiciones: una etapa inicial de desnaturalización a 50°C durante 2 minutos, seguida de una desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, y luego 45 ciclos de amplificación a 95°C durante 15 segundos y a 58°C durante 1 minuto (Stoddard et al., 2009).

Para el SNP 111, el master mix se preparó con 1x de TaqMan® Genotyping Master Mix, 0.4 μM de la sonda Sapro probe, 0.9 μM de cada uno de los cebadores (F2, R3B), y agua. Las condiciones de amplificación fueron las mismas que para Lip32, con una etapa inicial de desnaturalización a 50°C durante 2 minutos, seguida de una desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, y luego 45 ciclos de amplificación a 95°C durante 15 segundos y a 58°C durante 1 minuto (Barragan et al., 2016; E. Miller et al., 2021).

Resultados

Este estudio se propuso como objetivo identificar *Leptospira* spp en las muestras de saladeros recolectadas. De las 20 muestras analizadas, un total de 15 presentaron amplificación del gen 16S (Figura 3). Esto indica que se detectó ADN bacteriano en las muestras y que la amplificación de la región 16S fue exitosa, lo que sugiere que no hubo inhibición en las muestras y que la extracción de ADN fue satisfactoria. Las muestras que salieron negativas son provenientes de los saladeros GP3 y GP4 y CH2 Y CH3.

Figura 3. Resultados de la PCR convencional del gen 16S



El análisis del ensayo con lipL32 y SNP 111 reveló la ausencia de amplificación en las muestras, indicando resultados negativos (Figura 4, Figura 5). Esta observación fue contrastada con el control positivo el cual es la bacteria como tal, donde se evidenció un aumento significativo en la fluorescencia, lo cual no se reflejó en la curva de amplificación de las muestras.

Figura 4. Análisis de PCR en tiempo real del gen lipL32 del ADN extraído de las 20 muestras de saladeros., Controles positivos (curva en verde) - muestras (curva azul).

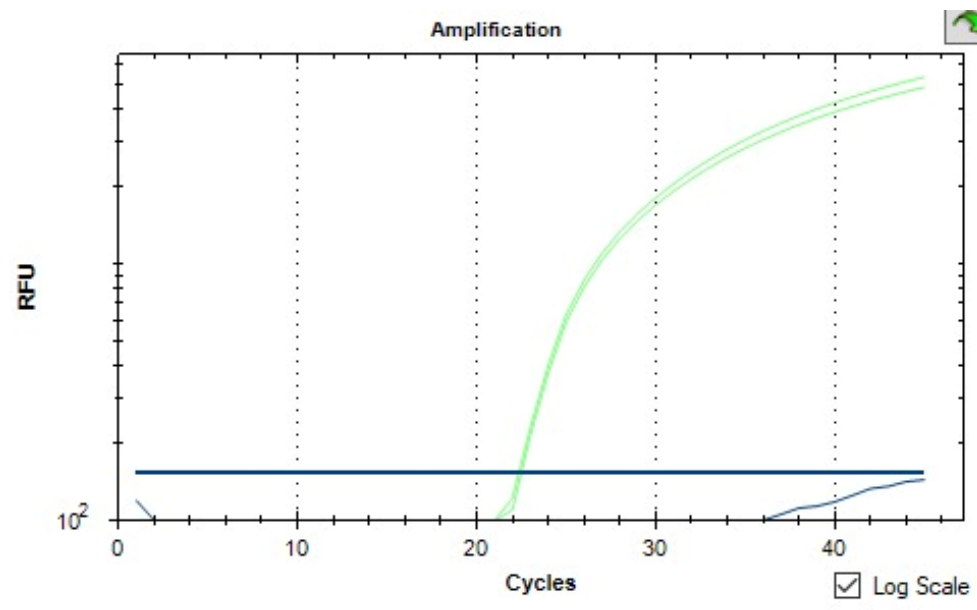
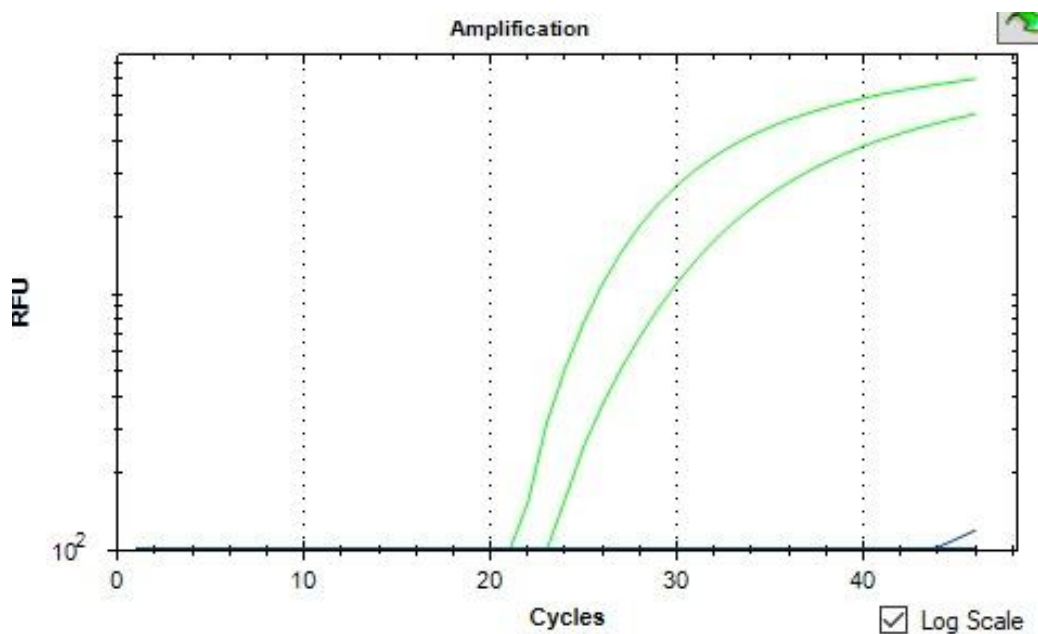


Figura 5. Análisis de PCR en tiempo real del gen SNP 111 del ADN extraído de las 20 muestras de saladeros., Controles positivos (curva en verde) - muestras (curva azul).



Discusión

Los saladeros parecen ser importantes para que esta bacteria este presente, debido a la temperatura, las precipitaciones y la cantidad de animales silvestres que concurren en esos lugares. Sin embargo, la presencia de ácidos húmicos puede generar una inhibición en la muestra.

Las muestras ambientales, particularmente el suelo, contienen una cantidad significativa de sustancias húmicas, compuestos orgánicos generados por la descomposición de la lignina. Se ha identificado que estas sustancias son las principales responsables de la inhibición de la PCR en muestras de suelo y sedimento (Sidstedt et al., 2020). Dentro de este grupo de sustancias húmicas, además de los ácidos húmicos, también pueden encontrarse los ácidos fúlvicos, en proporciones variables dependiendo del tipo de suelo (Albers et al., 2013).

Se ha observado que los ácidos húmicos no se unen al ADN en condiciones normales, y se ha propuesto que las estructuras fenólicas presentes en las sustancias húmicas podrían ser responsables de la inhibición de la ADN polimerasa. En cuanto a la inhibición de la detección de fluorescencia, se ha demostrado que ciertos fluoróforos, como SYBER Green, EvaGreen y ROX, pueden experimentar inhibición en la emisión de fluorescencia, si bien la magnitud de esta inhibición puede variar (Sidstedt et al., 2020).

Otro aspecto importante a considerar, es el método de conservación de las muestras, ya que este influye significativamente en el grado de degradación y calidad del ADN obtenido. La degradación del ADN puede ser causada por diversos factores, como la exposición a los rayos UV, altas temperaturas ambientales y ciclos repetidos de congelación y descongelación. Existen varias alternativas para la preservación de muestras, como el almacenamiento con nitrógeno líquido que se caracteriza por temperaturas extremadamente

bajas (-180°C) o el uso de soluciones buffer específicas como Shield 1x o DESS. Un estudio comparativo de métodos de almacenamiento en muestras de suelo concluyó que ambos buffers mostraron un rendimiento satisfactorio. Pero, el uso de estos buffers nos puede llevar a obtener variaciones en la estructura taxonómica de la muestra. Es importante tener en cuenta que ninguna solución de almacenamiento puede igualar los resultados obtenidos con muestras conservadas a -180°C, las cuales demostraron ser las más efectivas, debido a que termina rápidamente los procesos metabólicos en las células bacterianas, sin embargo, su mayor desventaja es que existen múltiples restricciones para su transporte. (Pavlovskaya et al., 2021).

El buffer, como el Shield 1x utilizado para preservar las muestras de suelo en los saladeros, si bien su rendimiento se ve influenciado por las propiedades químicas y físicas específicas de las muestras. Este agente se presenta como una alternativa viable en situaciones donde no se dispone de la opción de almacenamiento a temperaturas ultra bajas (-180°C). Sin embargo, es importante considerar que su efectividad puede variar según las características individuales de las muestras y se recomienda una evaluación detallada de estas propiedades para determinar su idoneidad como método de preservación.

En el estudio de Blake et al. (2011), se identificó al tamandú (*Tamandua tetradactyla*) como una de las especies que frecuentan los saladeros, siendo avistada específicamente en el saladero chorongó (CH). Además, el tapir (*Tapirus terrestris*) fue observado en los cuatro saladeros estudiados, mientras que el coati (*Nasua nasua*) fue avistado en dos de ellos. Estos hallazgos sugieren una amplia distribución de estas especies en el área de estudio.

Es importante destacar que existen estudios previos que documentan la presencia de *Leptospira* en estas especies y otras. Sousa et al. (2020) detectó *Leptospira interrogans* en

Tamanduas del Brasil por medio de detección patológica y molecular, encontrando la bacteria en 7 ejemplares juveniles, demostrando además que estos individuos son más susceptibles a esta edad y que la infección puede ser mortal. En el caso de los tapires (*Tapirus terrestris*), Fernandes – Santos et al. (2019) evaluaron la salud de un total de 35 tapires en Brasil. Se les realizó exámenes serológicos, específicamente el test de aglutinación en donde se reveló una alta prevalencia con un 60% de anticuerpos detectables contra *L. interrogans*, lo que indica exposición previa a la bacteria. Por otro lado, el estudio de Fornazari et al. (2018) en Brasil reveló una alta prevalencia de reacciones positivas en coatís (*Nasua nasua*) mediante el test de aglutinación (35.7%) y la prueba de PCR (8.9%), lo que sugiere una significativa exposición y posible infección por *Leptospira* en esta especie. . En el caso de *Didelphis marsupialis* según Souza Rocha et al. (2020) 1 de 3 individuos dieron positivo a *Leptospira* spp en muestras de tejido de riñón. Con respecto a la especie de murciélagos Matthias et al. (2005) realizaron estudios de una variedad de murciélagos en la Amazonia del Perú en donde de 38 muestras de *Sturnia lilium* 3 resultaron positivos a *Leptospira*.

Por lo antes mencionado, podríamos suponer que a pesar de que se hayan obtenido resultados negativos no se puede descartar la existencia de *leptospira* en los saladeros. Hay varios factores que pueden influir en la conservación del ADN y, por lo tanto, en la obtención de resultados precisos. No es que la bacteria no esté presente, sino que puede deberse al conservante utilizado, como el shield, o a la presencia de compuestos orgánicos en la muestra que causan inhibición.

Además, la fauna que habita en estos sitios puede ser portadora de *Leptospira*. En los saladeros a los que se tomaron muestras, se observaron una variedad de especies, algunas de las cuales ya han sido objeto de estudios previos sobre la presencia de la bacteria. Por lo tanto, es posible que algunas especies podrían albergar y diseminar la bacteria en los

alrededores de los saladeros, dado su comportamiento, como la geofagia, y la convergencia de múltiples especies en un mismo espacio y tiempo en estos sitios.

Por lo tanto, es importante continuar investigando este tipo de muestras utilizando diferentes metodologías para lograr resultados óptimos. En este sentido, se recomienda considerar cambiar el método de recolección de muestras, realizar un muestreo seriado de meses en el mismo sitio, en donde se busque temporadas con altas precipitaciones y donde se observe movimiento recurrente de animales. Además, el uso de otro método de extracción de ADN, como el SDS. El estudio realizado por Natarajan et al. (2016) diferencia varios métodos de extracción para muestras de suelo marino, las cuales poseen un alto contenido de compuestos húmicos, metales pesados y minerales cargados, factores que pueden afectar la cantidad y calidad del ADN y, por ende, dificultar los análisis de PCR. El SDS modificado evaluado en el estudio mostró una eficiencia del 99%, en comparación con el kit estándar que alcanzó el 94.9%. Dado que los suelos de los saladeros comparten características similares con los suelos marinos estudiados, sería pertinente probar este nuevo método de extracción en este contexto. Esto podría mejorar considerablemente la eficacia de la extracción de ADN.

En conclusión, los saladeros representan una zona de interés importante para el estudio de la *Leptospira* y ofrecen una oportunidad para investigaciones adicionales sobre la epidemiología de esta bacteria en la fauna silvestre. La posibilidad de encontrar la presencia de la bacteria en estos sitios no debe descartarse. La detección de la *Leptospira* en estos entornos nos proporcionaría información crucial sobre el riesgo de transmisión al que se enfrentan los animales que frecuentan estos lugares.

Referencias

- Adler, B., & de la Peña Moctezuma, A. (2010). Leptospira and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, *140*(3–4), 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
- Albers, C. N., Jensen, A., Bælum, J., & Jacobsen, C. S. (2013). Inhibition of DNA Polymerases Used in Q-PCR by Structurally Different Soil-Derived Humic Substances. *Geomicrobiology Journal*, *30*(8), 675–681. <https://doi.org/10.1080/01490451.2012.758193>
- Ayotte, J. B., Parker, K. L., & Gillingham, M. P. (2008). Use of Natural Licks by Four Species of Ungulates in Northern British Columbia. *Journal of Mammalogy*, *89*(4), 1041–1050. <https://doi.org/10.1644/07-MAMM-A-345.1>
- Barragan, V., Chiriboga, J., Miller, E., Olivas, S., Birdsell, D., Hepp, C., Hornstra, H., Schupp, J. M., Morales, M., Gonzalez, M., Reyes, S., Cruz, C. De la, 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 Neglected Tropical Diseases*, *10*(9), e0004990. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004990>
- Best, E. C., Joseph, J., & Goldizen, A. W. (2013). Facultative geophagy at natural licks in an Australian marsupial. *Journal of Mammalogy*, *94*(6), 1237–1247. <https://doi.org/10.1644/13-MAMM-A-054.1>
- Bierque, E., Thibeaux, R., Girault, D., Soupé-Gilbert, M.-E., & Goarant, C. (2020). A systematic review of Leptospira in water and soil environments. *Plos ONE*, *15*(1), e0227055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227055>

- Blake, J. G., Mosquera, D., Guerra, J., Loiselle, B. A., Romo, D., & Swing, K. (2011). Mineral Licks as Diversity Hotspots in Lowland Forest of Eastern Ecuador. *Diversity*, 3(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/d3020217>
- Calvopiña, M., Romero-Alvarez, D., Vasconez, E., Valverde-Muñoz, G., Trueba, G., Garcia-Bereguiain, M. A., & Orlando, S. A. (2023). Leptospirosis in Ecuador: Current Status and Future Prospects. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(4), 202. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8040202>
- Davignon, G., Cagliero, J., Guentas, L., Bierque, E., Genthon, P., Gunkel-Grillon, P., Juillot, F., Kainiu, M., Laporte-Magoni, C., Picardeau, M., Selmaoui-Folcher, N., Soupé-Gilbert, M.-E., Tramier, C., Vilanova, J., Wijesuriya, K., Thibeaux, R., & Goarant, C. (2023). Leptospirosis: Toward a better understanding of the environmental lifestyle of *Leptospira*. *Frontiers in Water*, 5. <https://doi.org/10.3389/frwa.2023.1195094>
- Fernandes-santos, r. C., medici, e. P., testa-josé, c., & micheletti, t. (2019). Health assessment of wild lowland tapirs (*tapirus terrestris*) in the highly threatened cerrado biome, brazil. *Journal of wildlife diseases*, 56(1), 34–46. <https://doi.org/10.7589/2018-10-244>
- Fornazari, F., Langoni, H., Marson, P. M., Nóbrega, D. B., & Teixeira, C. R. (2018). *Leptospira* reservoirs among wildlife in Brazil: Beyond rodents. *Acta Tropica*, 178, 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.11.019>
- Lihan, S., Jalin, F. J. E., Mohd-Azlan, J., Toh, S. C., & Chai, L. C. (2022). The characterization of Enterobacteriaceae and Pseudomonadaceae isolated from natural salt licks in Sarawak Borneo. *Food Research*, 6, 350–359. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.6\(3\).208](https://doi.org/10.26656/fr.2017.6(3).208)

- Matthias, m. A., díaz, m. M., campos, k. J., calderon, m., willig, m. R., pacheco, v., gotuzzo, e., gilman, r. H., & vinetz, j. M. (2005). Diversity of bat-associated leptospira in the peruvian amazon inferred by bayesian phylogenetic analysis of 16s ribosomal dna sequences. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(5), 964–974.
- Miller, C. S., Handley, K. M., Wrighton, K. C., Frischkorn, K. R., Thomas, B. C., & Banfield, J. F. (2013). Short-Read Assembly of Full-Length 16S Amplicons Reveals Bacterial Diversity in Subsurface Sediments. *Plos ONE*, 8(2), e56018.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056018>
- Miller, E., Barragan, V., Chiriboga, J., Weddell, C., Luna, L., Jiménez, D. J., Aleman, J., Mihaljevic, J. R., Olivas, S., Marks, J., Izurieta, R., Nieto, N., Keim, P., Trueba, G., Caporaso, J. G., & Pearson, T. (2021). Leptospira in river and soil in a highly endemic area of Ecuador. *BMC Microbiology*, 21(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02069-y>
- Natarajan, V. P., Zhang, X., Morono, Y., Inagaki, F., & Wang, F. (2016). A Modified SDS-Based DNA Extraction Method for High Quality Environmental DNA from Seafloor Environments. *Frontiers in Microbiology*, 7, 986.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00986>
- Pavlovska, M., Prekrasna, I., Parnikoza, I., & Dykyi, E. (2021). Soil Sample Preservation Strategy Affects the Microbial Community Structure. *Microbes and Environments*, 36(1), ME20134. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME20134>
- Rodicio, M. Del R., & Mendoza, M. Del C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del arnr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238–245.

- Sidstedt, M., Rådström, P., & Hedman, J. (2020). PCR inhibition in qpcr, dpcr and MPS—mechanisms and solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *412*(9), 2009–2023. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02490-2>
- Soo, Z. M. P., Khan, N. A., & Siddiqui, R. (2020). Leptospirosis: Increasing importance in developing countries. *Acta Tropica*, *201*, 105183. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105183>
- Sousa, M. S., Cristiny Rodrigues Silva, M. L., Santos Azevedo, S., Araújo Júnior, J. P., Malossi, C. D., Sabrina Ullmann, L., Nascimento, H. H. L., Kommers, G. D., Nery, T. F. L., & Lucena, R. B. (2020). *Leptospira interrogans* infection of southern tamanduas (*Tamandua tetradactyla*, Linnaeus, 1758) in Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, *67*(5), 2222–2225. <https://doi.org/10.1111/tbed.13523>
- Souza Rocha, K. De, Schupp De Sena Mesquita, G., Silva Ferreira, M. F., Leite Barros, F. De N., Macedo, R. C. S. De L., Araújo Saraiva, E. De, Mendes-Oliveira, A. C., Duarte Cerqueira, V., Scofield, A., Goes Cavalcante, G., Abel, I., & Guimarães De Moraes, C. C. (2020). New records of *Leptospira* spp. In wild marsupials and a rodent in the eastern Brazilian Amazon through PCR detection. *Acta Amazonica*, *50*, 305–308. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201903683>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014>
- Vieira, A. S., Pinto, P. S., & Lilenbaum, W. (2018). A systematic review of leptospirosis on wild animals in Latin America. *Tropical Animal Health and Production*, *50*(2), 229–238. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1429-y>

