

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Detección de especies de *Leptospira* en suero sanguíneo humano

Jorge Ignacio Chiriboga Miño

Gabriel Trueba, Ph.D., Director de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito
para la obtención del título de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Quito, Febrero 2014

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Detección de especies de *Leptospira* en sueros humanos

Jorge Ignacio Chiriboga Miño

Gabriel Trueba, Ph.D.
Director de Tesis

María de Lourdes Torres, Ph.D.
Miembro del Comité de Tesis

Verónica Barragán, M.S.
Miembro del Comité de Tesis

Stella de la Torre, Ph.D.
Decano del Colegio de Ciencias
Biológicas y Ambientales

Quito, Febrero de 2014

© DERECHOS DE AUTOR

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

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma: _____

Nombre: Jorge Ignacio Chiriboga Miño

C. I.: 172257647-5

Fecha: Febrero del 2014

Dedicatoria

A mis padres Janneth Soledad Miño Morillo y Jorge Vicente Chiriboga Flores
por estimular y cultivar mi espíritu humano.

Dedicado a todo aquel que se sienta comprometido con su existencia
y haya adquirido la sensibilidad de concebir mejor la realidad.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad San Francisco de Quito por haber creado la carrera de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos y permitirme desarrollar en lo que me apasiona.

A mis mentores Verónica Barragán y Gabriel Trueba, apreciados profesores que cálidamente me introdujeron al mundo científico.

A María del Lourdes Torres y Stella de la Torre por promover y mantener una exigencia académica y científica, que nos permite ser profesionales competentes en el área de la biotecnología.

A mis profesores quienes han compartido sus conocimientos académicos, experiencias, pero sobretodo su espíritu humano que han enriquecido mi formación.

Como son: José Salazar, Gerardo Cilveti, Salvatore Foti, Pablo Herrera, Paulina Andrade, Sonia Zapata, Venancio Arahana, Diego Cisneros, Renato León, Marcelo Albuja y César León.

A ustedes mis amigos con quienes compartí buenos y gratos momentos en la vida universitaria. Maru, Ma. Ines, Rosita, Dianita, Cris, Caro, Andre, Lore, Karlita, Gaby, Linda, Emi, Sofi, Carmen, Estefi, Nereida, Leonela, Ligia, Dani, Byron, Lucas, David, Milton, Alexis, Vini, Felipe, Andrés y muchos más.

Agradezco a los miembros de mi familia Alondra, Janneth, Vicente, tíos y abuelos por el apoyo incondicional en todo momento a pesar de las circunstancias.

Finalmente, con especial cariño, a mi enamorada Andrea Torres por ser mi compañera inseparable, confidente, pero sobre todo, por ser mi mejor amiga.

Resumen

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica que ha sido reconocida como un problema de salud pública a nivel mundial. Es una infección bacteriana aguda causada por varias especies de espiroquetas del género *Leptospira*. Las infecciones humanas resultan del contacto accidental con animales o ambientes contaminados con leptospiras. La fuente principal de contagio es la orina infectada de animales. En el Ecuador, es una de las enfermedades febriles con mayor presencia en la población humana, específicamente en las provincias de Manabí y Guayas. El diagnóstico, en el país, es complicado porque su sintomatología es ambigua y similar a otras enfermedades tropicales comunes como el dengue. Los métodos habituales de diagnóstico de laboratorio disponibles presentan limitaciones en sensibilidad, especificidad y tiempo. Por esta razón, es importante disponer de métodos de diagnóstico más apropiados que permitan detectar la infección de forma temprana e identificar la especie involucrada. En este estudio se desarrolló una metodología para detectar e identificar la especie de *Leptospira* presente en suero sanguíneo humano mediante: PCR en tiempo real, PCR convencional y secuenciación de amplicones. Además, para las especies intermedias de *Leptospira*, se diseñó y se evaluó en muestras clínicas el cebador Int. Se analizó 154 sueros sanguíneos de la ciudad de Guayaquil y 100 sueros sanguíneos del cantón Portoviejo. Los resultados mostraron la existencia de leptospirosis en un 29,2% para Guayaquil, y un 75% para Portoviejo. Del total de amplicones AB y CD secuenciados (n=84), la mayoría (89,5%) tuvo alta homología con la especie intermedia *L. wolffii*; mientras una minoría (10,5%) presentó homología con la especie patógena *L. borgpetersenii* y otra especie intermedia (*L. licerasiae*). Además, se secuenció amplicones A-Int y C-Int (n=33) de los sueros sanguíneos de Portoviejo; el 72,7% tuvo homología con la misma intermedia *L. wolffii* y el 6% presentó homología con otra especie intermedia (*L. inadai*) y una especie patógena (*L. interrogans*). Los resultados de esta investigación demuestran que la metodología utilizada es apropiada para la identificación de especies de *Leptospira* en suero sanguíneo humano y que puede emplearse como una herramienta epidemiológica.

Abstract

Leptospirosis is a zoonotic disease that has been recognized as a public health problem worldwide. It is an acute bacterial infection caused by various species of spirochetes of the genus *Leptospira*. Human infections result from accidental contact with animals or environments contaminated with leptospire. The bacterial primary source is the infected animal urine. In Ecuador, it is one of the most prevalent febrile diseases in the human population, specifically in the provinces of Manabí and Guayas. The diagnosis, in the country, is complicated because its symptoms are vague and similar to other common tropical diseases such as dengue. Usual procedures of laboratory diagnosis have limitations in sensitivity, specificity and time. For this reason, it is important to have more appropriate diagnostic methods which serve to identify an early infection and which the species are involved. In this study, a method was developed to detect and identify species of *Leptospira* in human blood serum by: real-time PCR, conventional PCR and sequencing of amplicons. Furthermore, for intermediate *Leptospira* species, it was designed and evaluated, in clinical samples, the primer Int. 154 sera from Guayaquil and 100 sera from Portoviejo were analyzed. The results showed the existence of 29.2% leptospirosis in Guayaquil, and 75 % in Portoviejo. Of all sequenced amplicons AB and CD (n = 84), the majority (89.5%) had high homology with the intermediate species *L. wolffii*, while a minority (10.5%) showed homology to the pathogenic species *L. borgpetersenii* and other intermediate species (*L. licerasiae*). Additionally, amplicons A-Int and C-Int (n = 33) of blood sera from Portoviejo were sequenced; 72.7% had homology with intermediate *L. wolffii* and 6% showed homology to other intermediate species (*L. inadai*) and a pathogenic species (*L. interrogans*). The results of this research show that the methodology is suitable for the identification of *Leptospira* species in human blood serum, and it can be used as an epidemiological tool.

TABLA DE CONTENIDO

Hoja de aprobación de tesis.....	ii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Resumen.....	vi
Abstract.....	vii
Tabla de contenido.....	viii
TABLAS.....	xi
FIGURAS.....	xii
1.Introducción.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.1.1. Características generales de <i>Leptospira spp.</i>	1
1.2. La zoonosis Leptospirosis.....	2
1.2.1. Sintomatología de la enfermedad.....	4
1.2.2. Epidemiología de la enfermedad.....	5
1.2.3. Diagnóstico de la enfermedad.....	6
1.3. Grupo Intermedio de <i>Leptospiraspp.</i>	8
1.4. Importancia de la PCR en tiempo real.....	8
1.5. Enfoque del problema.....	9
2. Objetivo General.....	10
3. Objetivos Específicos.....	10
4. Área de Estudio.....	11
5. Justificación.....	11

6. Materiales.....	12
6.1. Extracción ADN cepario <i>Leptospiras</i> USFQ (CTAB).....	12
6.2. Amplificación Genómica Completa de ADN referencial de <i>Leptospira spp.</i>	13
6.4. Extracción de ADN muestras de suero sanguíneo humano	13
6.5. Validación de PCR en tiempo real utilizando los primers AB/CD.....	13
6.6. Diseño del Primer Reverse Int	15
6.7. PCR convencional empleando Primer Reverse Int	15
6.8. Reamplificación de AB/CD en PCR Convencional.....	16
6.9. Secuenciación y Análisis de Secuencias	17
7. Metodología.....	18
7.1. Extracción <i>Leptospira spp.</i> del cepario de la Universidad San Francisco de Quito	18
7.2. Adquisición de Muestras de ADN referencial de <i>Leptospira spp.</i>	19
7.3. Amplificación Genómica Completa de ADN referencial de <i>Leptospira spp.</i>	20
7.4. Adquisición de muestras clínicas de suero sanguíneo humano de pacientes febriles	21
7.5. Extracción del ADN de las muestras clínicas de suero sanguíneo humano	21
7.6. Estandarización de Real Time PCR para AB/CD.....	22
7.7. Procesamiento de muestras clínicas de suero humano con PCR en Tiempo Real de AB/CD	24
7.8. Identificación y selección de los sueros sanguíneos positivos a <i>Leptospira spp.</i> en PCR en tiempo real.	26

7.9. Reamplificación de AB y CD mediante PCR.	27
7.10. Secuenciación de amplicones reamplificados en PCR	28
7.11. Obtención de secuencias consensos e identificación	29
7.12. Diseño y evaluación del primer R Inter.	30
8. Resultados	32
8.1. Estandarización de Real Time PCR para primers AB y CD.....	32
8.2. Sensibilidad de AB/CD de PCR en Tiempo Real y PCR Convencional.	33
8.3. PCR en Tiempo Real de AB y CD en muestras clínicas de suero humano.	35
8.4. Secuenciación de amplicones	35
8.5. Diseño del Primer específico para leptospiras pertenecientes al grupo Intermedio	36
9. Discusión	39
10. Conclusiones	43
11. Recomendaciones	45
12. Referencias	46
13. Tablas	51
14. Figuras.....	61
15. Anexos	69

TABLAS

Tabla 1. Listado del ADN referencial de <i>Leptospira spp.</i> ,	51
Tabla 2. Secuencias empleadas en el alineamiento de <i>Leptospira spp.</i>	52
Tabla 3. Master Mix con Supermix iQ para PCR en Tiempo Real de AB y CD.....	54
Tabla 4. Master Mix con EvaGreen para PCR en Tiempo Real de AB y CD.	54
Tabla 5. Master Mix con GoFlexi de reamplificación de AB y CD.	55
Tabla 6. Resultados detallados de los sueros del INSPI-Guayaquil.	56
Tabla 7. Resultados detallados de los sueros de Portoviejo con AB y CD.	57
Tabla 8. Especificidad del primer Reverse Int..	58
Tabla 9. Master Mix con GoFlexi de reamplificación de AB-Int y C-Intl.....	58
Tabla 10. Resultados detallados de los sueros de Portoviejo con A-Int y C-Int.....	59
Tabla 11. Resultados generales de los sueros de Portoviejo.....	60

FIGURAS

Figura 1. Sección variable del gen 16S ARNr de <i>Leptospira</i> ..	61
Figura 2. Ubicación y secuencia del Primer Int en el gen 16S ARN ribosomal de <i>Leptospira spp.</i>	62
Figura 3. Curvas de amplificación y Picos de Melting del gradiente para el fragmento AB.	62
Figura 4. Curvas de amplificación y Picos de Melting del gradiente para el fragmento CD.	63
Figura 5. Sensibilidad de PCR en Tiempo Real para el fragmento AB.	63
Figura 6. Sensibilidad de PCR convencional para el fragmento AB.....	64
Figura 7. Sensibilidad de PCR en Tiempo Real para el fragmento CD.	64
Figura 8. Curva estándar de sensibilidad para CD ajustada.	65
Figura 9. Sensibilidad de PCR convencional para el fragmento CD.....	65
Figura 10. Porcentaje de especies de <i>Leptospira</i> en los sueros identificados (INSPI-Guayaquil 2011).	66
Figura 11. Porcentaje de especies de <i>Leptospira</i> en los sueros identificados (Portoviejo 2012)..	66
Figura 12. Evaluación del primer Reverse Int (PCR A-Int) con especies Intermedias.	67
Figura 13. Evaluación del primer Reverse Int (PCR A-Int) con cepas Patógenas (USFQ).	67
Figura 14. Evaluación del primer Reverse Int (PCR A-Int y C-Int) en <i>Leptospira spp.</i> de referencias.	68

1. Introducción

1.1. Antecedentes

1.1.1. Características generales de *Leptospira spp.*

Las especies del género bacteriano *Leptospira* pertenece a la familia Leptospiraceae, este pertenece al orden Spirochaetales (Levett P. , 2011). Las leptospiras son espiroquetas con una conformación helicoidal con torsión hacia la derecha; con extremos bien definidos a manera de ganchos (Levett P. , 2011). Sus dimensiones celulares aproximadas son de 0,25 x 6-20µm con una apariencia cilíndrica (Bharti, 2003). Son bacterias altamente móviles debido a que disponen de dos flagelos en el espacio periplásmico con inserciones polares permitiéndole realizar movimientos de rotación y traslación (Levett P. , 2011). El genoma de la *Leptospira* consiste de dos cromosomas circulares, siendo el genoma más grande dentro del orden Spirochaetales (*Borrelia spp.* y *Treponema spp.*). Las leptospiras son organismos aerobios obligados que requieren de temperaturas entre 28 ° C a 30° C para su crecimiento, además de un pH entre 7.2 y 7.6 (Levett P. , 2011). Crecen en medio simple enriquecido con vitaminas B2 y B12, ácidos grasos de cadena larga y sales de amonio (Levett P. , 2011).

Su clasificación y nomenclatura es compleja. En la actualidad se disponen de dos sistemas diferentes de clasificación: uno en base a características fenotípicas (serológica) y el otro en base a homologías genéticas (filogenética) (Vijayachari P. S., 2008). Se ha descrito más de 60 serovares de *Leptospira biflexa* sensu lato y más de 200 serovares de *Leptospira interrogans* sensu lato ordenados en 24 serogrupos (Bharti, 2003). El sistema filogenético, o clasificación molecular, se basa en el secuenciación del gen 16S de ARNr (Levett P. , 2011). El sistema molecular ha identificado que el género *Leptospira* alberga a 21 especies clasificadas en tres grandes subgrupos: especies saprofíticas, especies

patógenas y especies intermedias (Ko, 2009). Las especies saprofíticas son: *L. biflexa* sensu estricto, *L. wolbachii*, *L. kmetyi*, *L. meyeri*, *L. vanthielii*, *L. Terpstrae*, *L. yanagawae* (Ko, 2009) y *L. idonii* (Saito, 2012). Las patógenas: *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. alexanderi* y *L. alstoni* (Ko, 2009). Y las intermedias: *L. inadai*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. wolffii* y *L. licerasiae* (Ko, 2009). El concepto de especie genómica en un procariota significa que su secuencia del genribosomal 16S difiera en más de un 3% (identidad menor al 97%) de los miembros de una especie (Mandigan, 2008). Por lo tanto una especie genómica de *Leptospira* es un grupo de serovares del género *Leptospira* cuyos ADNs muestran un 97% o más de homología (Vijayachari P. S., 2008).

1.2. La zoonosis Leptospirosis

La leptospirosis ha sido reconocida como un problema importante de salud pública global a causa de sus proporciones epidémicas y creciente incidencia en el mundo (Meites, 2004). Tiene una amplia distribución geográfica, se la encuentra en zonas tropicales, subtropicales y templadas (Vijayachari P. S., 2008). Es una infección bacteriana aguda causada por varias especies del género *Leptospira* (Waitkins, 1987).

El ciclo de transmisión de la leptospirosis involucra el reservorio animal, los portadores, el ambiente y los seres humanos (Waitkins, 1987). Hay una amplia diversidad de potenciales portadores mamíferos tanto en zonas urbanas como en zonas rurales. El principal portador involucrado como fuente principal de la infección humana son las ratas, en donde hay una tasa muy alta de prevalencia (Vijayachari P. S., 2008). Estas bacterias son susceptibles a factores ambientales, sobre todo a la sequedad. Sin embargo, pueden sobrevivir por largos periodos en el agua y en suelos húmedos (Vijayachari P. S., 2008).

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica que se mantiene por la colonización asintomática de los tubos renales proximales de animales portadores (Bharti, 2003). Como consecuencia la bacteria es constantemente eliminada en la orina (Bharti, 2003), siendo una fuente potencial de contagio constante para el ser humano.

La leptospirosis siempre afecta a animales de sangre caliente y en especial a los mamíferos. Los animales domésticos como el ganado en general pueden ser portadores potenciales de serovares específicos. Los principales serovares que afectan al ganado vacuno son Hardjobovis, Pomona y Grippotyphosa (Faine, 1994). La infección puede cubrir un amplio espectro, desde totalmente asintomática o presentar una enfermedad febril aguda, hasta complicaciones severas (Vijayachari P. S., 2008). Hay otros animales domésticos que pueden ser portadores como son los cerdos, ovejas y perros. En cerdos los serovares comunes son Pomona, Tarassovi, Grippotyphosa, Bratislava, Sejroe, Icterohaemorrhagiae y Canícola (Faine, 1994); usualmente no presentan sintomatología y llegan a ser portadores crónicos (Vijayachari P. S., 2008). Las ovejas son portadores a largo plazo, una vez infectadas pueden excretar *Leptospira* por más de un año (Cousins, 1989). En los perros es bien conocido que son portadores de los serovares Canicola y Icterohaemorrhagiae una vez que sobreviven a la nefritis crónica (Faine, 1994). Pero también pueden ser portadores animales salvajes como: leones de mar (Colagross-Schouten, 2002), roedores, marsupiales, murciélagos y algunos carnívoros (Bunnell, 2000).

La prevalencia de determinados serovares de *Leptospira* en la población humana depende de los reservorios animales presentes y de los serovares con los cuales estos están infectados (Bharti, 2003). En zonas con alta riqueza de especies, como en los trópicos (ej. Amazonas), la diversidad de animales salvajes permite encontrar una mayor diversidad de

leptospiras (Bunnell, 2000). No obstante, una simple especie de mamífero puede portar diferentes serovares dependiendo de la geografía en la que se encuentra (Tomich, 1979) (Sulzer, 1975). Asimismo, se conoce que poblaciones aisladas de mamíferos son importantes en el mantenimiento de serovares inusuales (Matthias, 2002), siendo portadores específicos. De cualquier manera, es muy conocido que para el ciclo de epidemiológico de la *Leptospira* es muy importante la presencia de un mamífero portador para su diseminación.

1.2.1. Sintomatología de la enfermedad

La leptospirosis puede imitar las manifestaciones clínicas de muchas otras enfermedades; sus descripciones incluyen una enfermedad bifásica (forma anictérica o aguda) y la enfermedad fulminante (forma icterohemorrágica o severa) (Farr, 1995). La fase aguda se caracteriza por una bacteremia en la cual se evidencia una fiebre de comienzo repentino; pero, pueden haber casos con síntomas débiles o incluso asintomáticos (Bharti, 2003). La leptospirosis aguda generalmente es caracterizada por fiebre, dolor de cabeza, mialgia severa, sufusión conjuntival, anorexia, náuseas, vómitos y postración (Bharti, 2003).

La fase más severa o enfermedad de Weil se produce después de la fase aguda, se caracteriza por ictericia, fallo renal y hemorragia con un curso clínico variable (Bharti, 2003). Solo una pequeña porción de los pacientes llegan a esta fase; en la cual manifiestan un hígado crecido y delicado debido a que se produce una necrosis hepática, una colestasis intrahepática e incrementando la carga de bilirrubina (ictericia) (Vijayachari P. S., 2008). El fallo renal es una de las complicaciones más serias y es la causa más común de muerte (Abdulkader, 1997). La muerte puede darse repentinamente por arritmias, falla cardiaca o

hemorragia adrenal a causa del fallo renal (Vijayachari P. S., 2008). También la causa de muerte puede ser el sangrado masivo de los tractos digestivo y respiratorio (Vijayachari P. S., 2008). Sobre todo este último produce la muerte a causa de dificultades respiratorias y toxicidad; la mortalidad en estos casos es muy alta pudiendo llegar al 50%-70% de los casos y superando a los casos con complicaciones hepáticas, renales o ambas, las cuales representan un 42,9% (Vijayachari P. S., 2008).

1.2.2. Epidemiología de la enfermedad

Hay dos formas de transmisión de la enfermedad, la directa y la indirecta (Vijayachari P. S., 2008). La transmisión directa ocurre cuando tejidos, fluidos u orina de animales portadores infectados o asintomáticos entran al cuerpo de un nuevo hospedero e inician la infección (Vijayachari P. S., 2008). La transmisión directa entre animales puede darse transplacentariamente (Ellis, 1978), hematógicamente, por contacto sexual (Vijayachari P. S., 2008) o a través de la lactancia desde una madre infectada (Boilin, 1988). Este tipo de transmisión es muy común entre animales y personas cuando involucran actividades ocupacionales en las cuales hay una manipulación de animales y sus tejidos como los carniceros, veterinarios, granjeros de ganado y cerdos, trabajadores en el control de roedores, entre otras (Vijayachari P. S., 2008).

La transmisión indirecta se da cuando un animal o ser humano ha adquirido la infección de leptospiras procedentes de la orina de animales portadores por medio del contacto con agua dulce (Faine, 1994). El portal de entrada más común para este patógeno es la piel (Faine, 1994). Las actividades ocupacionales también exponen a las personas a este tipo de transmisión sobretodo en la minería, mantenimiento de alcantarillas, maniobras militares, agricultura (Bharti, 2003) y practicantes de deportes acuáticos (Vijayachari P. S., 2008). Además, la transmisión indirecta es la más importante, en lo que se refiere a

epidemiología, ya que ciertas condiciones ambientales como largas temporadas de lluvias e inundaciones permiten infectar a un espectro mucho más amplio de posibles hospederos.

1.2.3. Diagnóstico de la enfermedad

Para el diagnóstico de la leptospirosis en la actualidad existen algunas técnicas de laboratorio como: microscopía, cultivo, serología y técnicas moleculares (Ko, 2009). La microscopía consiste en la visualización directa de leptospiras en material clínico por medio del microscopio de campo oscuro, inmufluorescencia o microscopia de luz con una tinción apropiada (Levett P. , 2011). Sin embargo, la microscopía puede carecer de sensibilidad o especificidad al examinar directamente muestras de sangre, orina, líquido céfalo raquídeo o fluidos dializados (Vijayachari P. S., 2001).

El cultivo es el diagnóstico definitivo para la leptospirosis, básicamente consiste en la recuperación de *Leptospira spp.* a partir de muestras clínicas (Bharti, 2003). Para el aislamiento de la bacteria se tiene que inocular la muestra clínica en 10mL de medio Ellinghausen-Mc Cullough-Johnson-Harris (EMJH) semisólido, el cual de ser incubado en frascos cerrados a 28° C-30° C y examinado semanalmente con el microscopio de campo oscuro (Levett P. , 2011). El crecimiento se evidencia como una banda discreta, pocos milímetros debajo de la superficie, lo cual se conoce como anillo de Dinger (Levett P. , 2011). Para el cultivo de muestras de sangre o líquido céfalo raquídeo, la muestra debe tomarse en la fase de leptospiremia, ésta ocurre en los primeros 10 días de la infección. A partir de esta fase, las leptospiras vivas sólo se encontrarán en la orina (Levett P. , 2011). Lamentablemente, la sensibilidad del cultivo es muy baja, sin mencionar que en ocasiones requiere semanas para determinar su positividad (Bharti, 2003).

La serología es el diagnóstico más usado, para el cual se emplea la prueba de aglutinación microscópica (MAT); se le considera de referencia estándar por su alta especificidad y sensibilidad (Cumberland, 1999). El MAT consiste en la reactividad del suero sanguíneo del paciente ante suspensiones de antígenos vivos o muertos de serovares leptospirales (Levett P. , 2011). Después de un periodo de incubación la mezcla suero-antígenos es examinada al microscopio para evidenciar la aglutinación (Levett P. , 2011). Se emplea un rango de antígenos en los que se incluyen serovares representativos de todos los serogrupos (Turner L. , 1968); de tal manera que se pueda detectar infecciones con serovares poco comunes o previamente no detectados (Levett P. , 2011). El inconveniente con el MAT es la interpretación, es complicada porque hay alto grado de reacción cruzada entre diferentes serogrupos particularmente en muestras con fase aguda (Levett P. , 2011).

Dentro de las técnicas moleculares, se han desarrollado algunas propuestas empleando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de ADN de *Leptospira* identificando algunos genes *rrs* (16S ARNr) (Monrey, 2006), *gyrB* (Slack, 2006), *rpoB* (La Scola, 2006) o *secY* (Victoria, 2008). La PCR es más sensible que el cultivo, comparable al diagnóstico serológico de MAT tanto en fase aguda y convaleciente en varios tipos de muestras: suero sanguíneo, orina, humor acuoso, líquido céfalo raquídeo y de tejidos obtenido en autopsias (Merien, 1995). La diferencia es que ofrece un diagnóstico más rápido durante la enfermedad aguda (Brown, 1995). El diagnóstico molecular tiene un alto grado de detección debido a que es capaz de detectar una pequeña cantidad del ADN del patógeno en muestras clínicas y en etapas tempranas de la enfermedad (Mérien F. A., 1992). La limitante de este método es la incapacidad que tiene la técnica para identificar los serovares (Levett P. , 2011). Es así que a pesar de ser una

excelente herramienta de diagnóstico, la PCR que amplifica los fragmentos AB y CD del gen 16S ARNr solo permite identificar el género *Leptospira spp.* (Mérien F. A., 1992).

1.3. Grupo Intermedio de *Leptospiraspp.*

El grupo Intermedio es uno de los tres grupos filogenéticos en los que se clasifican las especies de *Leptospira*. Esta división recoge a especies cuya patogenicidad no está definida (Ko, 2009). Se han hallado algunas especies de este grupo en muestras clínicas tanto de humanos como de animales con sintomatología de leptospirosis. Es así que se halló *L. broomii* en un dos pacientes humanos tanto en Francia como en Dinamarca (Levett P. M., 2006). En Australia se ha encontrado *L. fainei* en úteros y riñones de cerdos y en vacas (Perolat, 1998). En este mismo país se ha encontrado reactividad serológica para *L. fainei* en humanos (Chappel, 1998). En países europeos ya se han reportado casos de pacientes humanos con leptospirosis obteniendo aislados de *L. fainei* (Arzouni, 2002) (Petersen, 2001). En el Ecuador, mediante técnicas moleculares, se ha identificado *L. inadai* en muestras de orina provenientes de ganado vacuno (Baquero, 2010).

La evidencia de la infección y de sintomatología clínica (en humanos y otros animales) demuestra patogenicidad de las especies intermedias (Ko, 2009). Este hecho resalta la necesidad de disponer de técnicas moleculares más sencillas y rápidas que permitan avanzar en la discriminación de las especies de *Leptospira* causantes de infección en el diagnóstico.

1.4. Importancia de la PCR en tiempo real

Para un adecuado manejo y tratamiento de pacientes con leptospirosis, es necesario un diagnóstico rápido en el laboratorio. La PCR en tiempo real ofrece algunos beneficios en comparación a métodos convencionales, como son la reducción de contaminantes,

reducción de tiempo, y una detección específica del ADN bacteriano (Merián, 2005). Actualmente, la PCR en tiempo real se perfila como una alternativa rápida y sensible respecto para el diagnóstico de la leptospirosis (Ahmed A. A., 2012). Hoy por hoy, existe una variedad de genes que se utilizan para dicho diagnóstico: *liga*, genes B, *rrs* (ARNr 16S), *gyrB*, el locus para LA0322 (proteína hipotética) y *lipL32* (Ahmed A. A., 2012). Pero, todavía continúa la limitación en la incapacidad de identificar las cepas de especies causantes de infección, a nivel de serogrupo o serovar (Merián, 2005). Es así que, considerando el bajo nivel de ruido en la secuencia del gen *rrs* (ARNr 16S), es un candidato idóneo para ser empleado en la discriminación entre grupos de leptospiras (Ahmed A. A., 2012).

1.5. Enfoque del problema

La leptospirosis es una enfermedad muy grave y complicada; existen varios reservorios animales, diversidad genética y amplia distribución mundial. La leptospirosis tiene alta prevalencia en humanos en las provincias tropicales del Ecuador (Manock, 2009).

Existen dos formas de combatir la enfermedad, una mediante tratamiento antibiótico, la cual es efectiva siempre y cuando se haya dado un diagnóstico oportuno y certero de la misma (Vijayachari P. S., 2008); y la prevención, la cual consiste en la identificación de la fuente de las leptospiras (reservorio y/o portadores) para interrumpir el ciclo de transmisión (Faine, 1994). Ya sea por inmunización (ganado) (Little, 1992), quimioprofilaxis (Sehgal, 200), vacunación (seres humanos) (Torten, 1973) o sacrificio de los animales infectados (Vijayachari P. S., 2008).

Para el control de la enfermedad, tanto en la diagnosis como en el rastreo epidemiológico, es indispensable identificar las especies de *Leptospira* en muestras clínicas de humanos y animales portadoras de la enfermedad en cada región. La genotipificación de leptospiras es complicada debido a la dificultad en aislar esta bacteria a partir de muestras clínicas. El presente estudio pretende validar técnicas moleculares que nos permitan llegar a identificar las especies de *Leptospira* que están circulando en humanos y otros animales en el Ecuador.

2. Objetivo General

Identificar especies de *Leptospira* en muestras clínicas de suero sanguíneo humano empleando PCR en tiempo real y secuenciación de amplicones.

3. Objetivos Específicos

- Estandarizar una PCR en tiempo real para la amplificación de los fragmentos AB y CD del gen *rss* (ARNr 16S) de *Leptospira* en suero humano.
- Identificar región(es) única(s) en el gen ARNr 16S características para especies de *Leptospira* Intermedias.
- Diseñar primer que tengan complementariedad a dichas regiones para identificar *Leptospira* del grupo intermedio mediante la técnica de PCR convencional.
- Identificar la presencia de leptospiras del grupo Intermedio en muestras de suero sanguíneo humano de pacientes febriles y pacientes diagnosticados de leptospirosis.

- Determinar con secuenciación la especie de *Leptospira* en los sueros sanguíneos de pacientes febriles de Portoviejo y Guayaquil.

4. Área de Estudio

Es estudio empleó muestras clínicas de suero sanguíneo humano de pacientes con sintomatología febril, en algunos casos identificados con leptospirosis serológicamente, provenientes de los centros regionales del INSPI tanto de la provincia de Guayaquil como de la provincia de Portoviejo. En el caso de Portoviejo, los sueros evaluados fueron seleccionados de la ciudad de Portoviejo y del poblado de Calderón. En el Laboratorio del Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito se realizó la extracción de ADN de los sueros sanguíneos, su diagnóstico molecular con PCR en tiempo real, reamplificación con PCR convencional y el análisis de las secuencias para la identificación de la especie de *Leptospira*.

5. Justificación

La leptospirosis es una enfermedad de alta presencia sobre todo en zonas tropicales del planeta. En el Ecuador ocurren casos frecuentes de esta enfermedad siendo la provincia de Manabí la zona con mayor porcentaje de positividad. El control de la leptospirosis se dificulta por dos factores: sintomatología inespecífica y un diagnóstico inapropiado e inoportuno. El primero es debido a que presenta síntomas ambiguos muy similares con otras enfermedades tropicales, como el dengue, lo cual ocasiona diagnóstico equivocado y tratamiento inapropiado. El segundo, es causado por las debilidades de los métodos de diagnósticos; tiempo excesivo y dificultad de cultivo, baja sensibilidad (microscopía), y reacción cruzada (MAT y ELISA). La PCR es la mejor opción en el diagnóstico temprano, con una alta sensibilidad y rapidez. Sin embargo, es incapaz de discriminar entre las

especies de *Leptospira*. Es así que se pretende desarrollar una metodología robusta de diagnóstico molecular, en base a la técnica PCR, para la leptospirosis en muestras clínicas (suero sanguíneo) en humanos. De tal manera que sirva como una herramienta epidemiológica para rastrear a la *Leptospira* a lo largo de todo su ciclo epidemiológico. Además, se busca con este trabajo avanzar en la discriminación de la *Leptospira*; inicialmente identificando el grupo y luego identificando la especie. De esta manera, se pretende aportar en el fortalecimiento de la técnica del PCR en el diagnóstico de la leptospirosis. Hasta el momento existe problemas en la identificación específica del agente etiológico.

6. Materiales

6.1. Extracción ADN del cepario de Leptospiras USFQ (CTAB)

- Cultivos de *Leptospira spp.* Identificadas por serología en medio EMJH líquido (Anexo 1).
- PBS 1X (8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na₂HPO₄, 0.24g KH₂PO₄ en 800mL H₂O destilada a pH 7.4).
- CTAB (Cetyltrimethyl Ammonium Bromide) Merk™
- Cloroformo J.T. Baker.
- Alcohol isoamílico. Reactivos H.V.O.
- Acetato de sodio 3M. Reactivos H.V.O.
- Etanol 70%. Panreac.

- TE (10mL Tris-Cl 1M, 2 mL EDTA Invitrogen™ 0.5M pH 8 en 80 mL H₂O destilada).
- Microcentrifuga Eppendorf® Model 5415D.

6.2. Amplificación Genómica Completa de ADN referencial de *Leptospira spp.*

- ADN de *Leptospira spp.* provenientes del National Collaborating Centre for Reference and Research on leptospirosis (Tabla 1).
- GenomiPhi™ V2 DNA Amplification Kit, GE Healthcare.
- T100™ Thermal Cycler BioRad™.

6.4. Extracción de ADN muestras de suero sanguíneo humano

- PBS 1X (8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na₂HPO₄, 0.24g KH₂PO₄ en 800mL H₂O destilada a pH 7.4).
- Proteinasa K Qiagen™.
- QIAamp® DNA Blood Mini Kit Qiagen™.
- 200uL de suero sanguíneo humano de pacientes febriles.
- Microcentrifuga Eppendorf® Model 5415D.

6.5. Validación de PCR en tiempo real utilizando los primers AB/CD

- iQ™ SYBR® Green Super Mix BioRad™.
- SsoFast™ EvaGreen® Supermix BioRad™.

- Primer Forward A: 5'-GGCGGCGCGTCTITAAACATG-3'
- Primer Forward C: 5'-CAAGTCAAGCGGAGTAGCAA-3'
- Primer Reverse B: 5'-TTCCCCCATTGAGCAAGATT-3'
- Primer Reverse D: 5'-CTTAACCTGCTGCCTCCCGTA-3'
- Agua grado PCR.
- ADN de especies de *Leptospira*.
- PCR Strips Tubes de 0.2 mL. Axygen.
- Termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR BioRad
- SYBR® Safe DNA Gel Stain.
- TBE 1X (108g Ultra Pure™ Tris, 55g Ac. Bórico Panreac, 9.3 EDTA Invitrogen™ aforar a 1L con H₂O destilada y diluir 1:10).
- Ultra Pure™ Agarosa Invitrogen™.
- Cámara de Electroforesis C.B.S. Scientific Co. Model: MGU-502T.
- Fuente de Poder Fisher Scientific. Model: FB300.
- Fotodocumentador Kodak EDAS 290.

6.6. Diseño del Primer Reverse Int

- Secuencias del gen 16Sr RNA por cada especie tanto Patógenas; Intermedias como Saprófitas (Tabla 2).
- Secuencia de los Primers: A, B, C y D (Sección 6.1).
- Software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA5).
- Portal Web de la National Center for Biotechnology Information (NCBI).

6.7. PCR convencional empleando Primer Reverse Int

- Primer Forward A (Sección 6.5).
- Primer Forward C(Sección 6.5).
- Primer Reverse Int: 5'-TCT TTA CCT ATC ARA TCY TGT GAT CCA-3'
- GoTaq® Flexi Buffer Promega™.
- Solución de MgCl₂ 25mM.
- Mix de nucleótidos para PCR, cada uno a 10mM.
- Agua grado PCR.
- GoTaq® DNA Polimerase Promega™.
- ADN Leptospira spp. Intermedias.

- Amplicones de AB/CD en Real Time PCR positivos para *Leptospira spp.* en suero humano.
- Tubos de PCR 0.2mL. Axygen.
- T100™ Thermal Cycler BioRad™.
- Bromuro de Etidio.
- TBE 1X (108g Ultra Pure™ Tris, 55g Ac. Bórico Panreac, 9.3 EDTA Invitrogen™ aforar a 1L con H₂O destilada y diluir 1:10).
- Ultra Pure™ Agarosa Invitrogen™.
- Cámara de Electroforesis C.B.S. Scientific Co. Model: MGU-502T.
- Fuente de Poder Fisher Scientific. Model: FB300.
- Fotodocumentador Kodak EDAS 290.

6.8. Reamplificación de AB/CD en PCR Convencional

- Primer Forward A (Sección 6.5).
- Primer Forward C (Sección 6.5).
- Primer Reverse B (Sección 6.5).
- Primer Reverse D (Sección 6.5).
- GoTaq® Flexi Buffer Promega™.

- Solución de MgCl₂Promega™ 25mM.
- Mix de nucleótidos para PCR Promega™, cada uno a 10mM.
- Agua grado PCR.
- GoTaq® DNA Polimerase Promega™.
- Amplicones de AB/CD en Real Time PCR positivos para *Leptospira spp.* en suero humano.
- Tubos de PCR 0.2mL. Axygen.
- T100™ Thermal Cyclers BioRad™.
- Bromuro de Etidio.
- TBE 1X (108g Ultra Pure™ Tris, 55g Ac. Bórico Panreac, 9.3 EDTA Invitrogen™ aforar a 1L con H₂O destilada y diluir 1:10).
- Ultra Pure™ Agarosa Invitrogen™.
- Cámara de Electroforesis C.B.S. Scientific Co. Model: MGU-502T.
- Fuente de Poder Fisher Scientific. Model: FB300.
- Fotodocumentador Kodak EDAS 290.

6.9. Secuenciación y Análisis de Secuencias

- Amplicones de AB/CD de las muestras positivas (*Leptospira spp.*) de suero humano obtenidos en Real Time PCR .

- Archivos de Secuenciación remitidos por Funtional Biosciences, Inc.
- Software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA5).
- Software Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).
- Base de Datos GenBank®.

7. Metodología

7.1. Extracción *Leptospira spp.* del cepario de la Universidad San Francisco de Quito

El cepario de *Leptospira* de la Universidad San Francisco de Quito cuenta con 23 cepas de *Leptospira spp.* patógenas clasificadas serológicamente (Anexo 1), de las cuales se las extrajo ADN mediante la metodología CTAB. Previo a la extracción, a cada una de las cepas se las revisó con el microscopio de campo oscuro para evaluar la presencia de contaminación y un óptimo estado de conservación. Cada una de las cepas que fueron procesadas, antes de su extracción, fueron pasadas de medio EMJH semi-sólido a medio EMJH líquido, incubándolas a 30° C por 7 días, para obtener la fase exponencial. Después de apreciar un crecimiento abundante de *Leptospira* (turbidez visual) en los tubos de cultivo; se realizó una nueva revisión de las condiciones de crecimiento de las bacterias al microscopio del campo oscuro, para garantizar muestras sin contaminación y alta población bacteriana para la extracción.

Para la extracción se usó 1mL de medio de cultivo líquido de cada una de las cepas disponibles (en tubos eppendorf de 1.5mL); el cual se centrifugó a 8.944g por 3 minutos hasta obtener un pellet. El sobrenadante se desechó, y se agregó 1000mL de PBS 1X para lavar las células, re-suspendiéndolas. Posteriormente, se repitió la centrifugación y la

eliminación del sobrenadante. El pellet fue tratado con 700µL de solución CTAB se lo incubó a 65°C por 30 minutos con agitación del tubo cada 15 minutos. Después de enfriar la muestra hasta temperatura ambiente, se agregó 700µL de solución Cloroformo: Alcohol isoamílico (24:1) y se agitó hasta formar una emulsión. La muestra se centrifugó a 12.879g por 5 minutos, para obtener la formación diferencial de 2 fases con una interface. Seguidamente, la fase superior acuosa (transparente) se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 1.5mL, en un volumen aproximado de 300-500µL. Para obtener la precipitación del ADN, se adicionó 50µL de acetato de sodio 3M con pH 5 y 1mL de etanol helado al 100%, se mezcló por inversión y se dejó a -20°C toda la noche. Al día siguiente, se centrifugaron las muestras del cepario a velocidad máxima o a 17.530g por 10 minutos hasta visualizar un pequeño pellet de ADN, luego se descartó el sobrenadante. Para lavar el pellet, se agregó 1mL de Etanol al 70% y se resuspendió. De nuevo las muestras fueron centrifugadas a 17.530g por 10 minutos, y nuevamente se descartó el sobrenadante. El paso de lavado se repitió nuevamente y luego se dejó secar el pellet, con el tubo boca abajo, por aproximadamente 30 minutos. Finalmente, el ADN de cada cepa se resuspendió en 50µL de buffer TE estéril y se lo almacenó a -20°C.

7.2. Adquisición de Muestras de ADN referencial de *Leptospira spp.*

Se solicitó al Dr. Rudy Hartskeerl (National Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Amsterdam, The Netherlands), alícuotas de ADN de 50 cepas, pertenecientes a 17 especies de *Leptospira*, identificadas y clasificadas molecularmente (Tabla 1).

7.3. Amplificación Genómica Completa de ADN referencial de *Leptospira spp.*

Una vez adquirido el ADN de referencia, se seleccionaron las alícuotas a ser sometidas al proceso de amplificación completa del genoma. Las prioritarias fueron las especies Intermedias (*L. broomii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. licerasiae* y *L. wolffii*); se las amplificó por dos ocasiones para garantizar su disponibilidad. También se amplificaron cepas de especies patógenas y/o saprofitas que no poseían replicado (*L. kmetyi*, *L. genomospecies 3* y *L. wolbachii*). Finalmente, se amplificaron las cepas con volúmenes reducidos de especies patógenas (*L. interrogans* Lai, *L. interrogans* Swart, *L. kirschneri* 3522C, *L. kirschneri* Moskva, *L. weilii* Cox, *L. alexanderi* A85, y *L. borgpetersenii* JB197 (Tabla 1).

Para la amplificación completa del genoma se empleó GenomiPhi™ V2 DNA Amplification Kit GE Healthcare. Inicialmente, se colocó 1µL del ADN de las cepas de referencia mencionadas, con 9µL Sample buffer en un tubo para PCR de 0.5µL, para someterlo a 95°C por 3 minutos en el termociclador y obtener la denaturación completa del ADN. Inmediatamente, el tubo fue colocado sobre hielo a 4°C para impedir que el ADN se hibride nuevamente. Posteriormente, se adicionó 9µL de Reaction buffer y 1µL de Enzyme mix para ser incubada por 30°C por 2 horas para conseguir la amplificación. Luego el ADN fue expuesto a 65° por 10 minutos en el termociclador, para inactivar la enzima. Finalmente, se obtuvo 20µL de ADN genómico, al cual se lo almacenó a -20°C.

7.4. Adquisición de muestras clínicas de suero sanguíneo humano de pacientes febriles

Para este estudio se dispuso de muestras de suero sanguíneo humano provenientes de pacientes que presentaron una sintomatología febril. Los sueros fueron proporcionados por el Laboratorio de la Cede Central de Guayaquil del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) gracias al Dr. Manuel González, los sueros (n=154) fueron recolectados en el año 2011 y diagnosticados negativos para dengue. También se obtuvieron sueros sanguíneos cedidos por el Laboratorio del INPI-Portoviejo gracias a la Lcda. Ana Mora. La mayoría de las muestras (n=66) no tuvieron un previo diagnóstico para dengue o leptospirosis y se recolectaron en los meses de Febrero, Mayo, Junio, Octubre y Diciembre del 2012 y de Enero del 2013. Además, se contó con sueros sanguíneos otorgados por la Clínica San Antonio del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social (IESS) de Portoviejo, facilitados por el Dr. Orlando Ramírez Sabando. Estos sueros (n=33) se recolectaron en el mes de Junio del 2012 y se los diagnosticó positivos para leptospirosis.

7.5. Extracción del ADN de las muestras clínicas de suero sanguíneo humano

Se dispuso de 254 muestras de suero sanguíneo humano de pacientes con sintomatología febril, de las cuales 154 muestras procedieron de Guayaquil y 100 muestras desde Portoviejo. Para la extracción de ADN se empleó el QIAamp® DNA Blood Mini Kit de Qiagen™ siguiendo el protocolo de extracción de Purificación de ADN desde sangre o fluidos corporales.

Los sueros humanos inicialmente fueron colocados en bloque frío, con la finalidad de conseguir un descongelamiento gradual para evitar la degradación del ADN de la

muestra. En tubos Eppendorf de 1.5mL se colocó 20µL de Proteinasa K, luego se adicionó 200µL del suero y 200µL de PBS 1X y 200µL de Buffer AL, se mezcló por vórtex durante 15 segundos y se incubó a 56° C por 10 minutos. Para remover las gotas de la tapa se realizó una pequeña centrifugación (spin) por 15 segundos. Seguidamente, se adicionó 200µL de etanol puro (96%), se mezcló por vórtex y centrifugó brevemente. Toda la mezcla fue transferida a una columna QIAamp Mini spin sobre un tubo de recolección de 2mL para ser centrifugada a 5.724g por 1 minuto. Posteriormente, se descartó el tubo de recolección con el filtrado y se colocó la columna en un nuevo tubo recolector. En la columna se depositó 500µL de Buffer AW1 y centrifugó a 5.724g por 1 minuto. De igual manera se descartó el tubo recolector con el filtrado y se colocó la columna en un nuevo tubo de recolector. Igualmente sobre la columna se agregó 500µL de Buffer AW2 y se lo centrifugó a velocidad máxima o 17.530g durante 3 minutos. El tubo recolector y el filtrado fueron descartados y la columna colocada sobre un tubo de microcentrífuga eppendorf nuevo de 1.5mL. Nuevamente, sobre la columna se agregó 90µL de Buffer AE y se incubó a temperatura ambiente (15-25° C) por 1 minuto. Finalmente, se centrifugó cada una de las muestras a 5.724g por 2 minutos, descartando la columna y obteniendo el ADN purificado.

Para conservar y optimizar el ADN extraído de las muestras de suero, el volumen total de 90µL obtenido fue dividido en tres alícuotas del mismo volumen (30µL), denominándolas A, B y C con el respectivo código de muestra, y almacenándolas a -20° C.

7.6. Estandarización de Real Time PCR para AB/CD

Para la detección de *Leptospira spp.* en muestras clínicas de suero humano, mediante la técnica de PCR en Tiempo Real, se emplearon los primers AB/CD (Mérien F.

A., 1992), sintetizados por Invitrogen™. Estos cebadores son oligonucleótidos muy eficientes y sensibles para la amplificación de fragmentos parciales de la secuencia del gen 16S ARN ribosomal del género *Leptospira spp.*, en PCR convencional.

La estandarización de las PCRs AB y CD en la modalidad de Tiempo Real comenzó determinando las condiciones de las etapas básicas de una PCR como son denaturación inicial, denaturación por ciclo y elongación. Para tal finalidad, se tomó en consideración las recomendaciones tanto en tiempo como en temperatura de la herramienta “Protocol AutoWriter” del CFX Manager™ Software Versión 2.1. En base al tipo de enzimas empleada, que para este caso fueron iQ™ y SSoFast™ pertenecientes a la misma casa comercial BioRad. El programa determinó las condiciones siguientes: denaturación inicial a 95° C por 3 minutos, denaturación en ciclo de 95° C por 30 segundos, extensión por ciclo a 72° por 30 segundos; durante 45 ciclos. Al final de los ciclos de amplificación se introdujo una etapa de denaturación de los posibles primer dimer a 80° C por 30 segundos. Adicionalmente, se programó el Melting Curve desde 65° C a 95° C con una rampa de 0.5° C cada 5 segundos.

Para determinar una temperatura de anclaje (annealing) adecuada tanto para AB como para CD, de tal manera que se puedan desempeñar con el mismo programa, inicialmente se calculó termodinámicamente la temperatura de denaturación (Tm) para cada uno de los 4 primers (A, B, C y D) empleando los programas libres en línea Oligonucleotide Properties Calculator (OligoCalc), Primer3 (v. 0.4.0) y la herramienta “Ta Calculator” del CFX Manager™ Software Version 2.1. Obtenida una referencia de la temperatura de annealing de los 4 primers; se prosiguió a realizar ensayos con gradiente, para la temperatura de annealing, de 58° C, 58.5° C, 59.4° C, 60.8° C, 62.5° C, 63.9° C, 64.2° C y 65° C durante 30 segundos; primero para AB y luego para CD.

La reacción de amplificación tanto de AB como para CD se las realizó para un volumen total de 10µL. El Master Mix se preparó con iQ™ SYBR® Green Super Mix o SsoFast™ EvaGreen® Supermix a 1X, 0,5µM de cada primer y se aforó con agua de grado PCR (Tabla 2 y 3). Por cada reacción se empleó 1µL de ADN sin cuantificación, provenientes del cepario de *Leptospira* de la USFQ. La PCR en tiempo real se desarrolló en el termociclador CFX96 Touch™.

Una vez realizada la amplificación de los fragmentos AB y CD en PCR en tiempo real, los amplicones obtenidos por gradiente fueron corridos en un gel de Agarosa al 1.5% con SYBR® Safe DNA Gel Stain, a condiciones de 70V por 50 minutos y referencia de tamaño (ladder) de 100pb; para comparar los resultados de fluorescencia con el tamaño, grosor e intensidad de las bandas.

Para evaluar la sensibilidad de detección de los fragmentos AB y CD se realizó ensayos en los que se conservó las mismas condiciones: volumen de reacción, volumen de ADN y concentración de ADN tanto en PCR en Tiempo Real como en PCR convencional. Para ello se empleó ADN de *L. wolffii* en diez diluciones seriales desde $1,2 \times 10^1$ ng/mL a 1×10^{-8} ng/mL.

7.7. Procesamiento de muestras clínicas de suero humano con PCR en Tiempo Real de AB/CD

Para la detección de *Leptospira spp.* en el ADN extraído de las muestras de suero humano, tanto del INSPI de Guayaquil (provincia de Guayas) como del INSPI de Portoviejo (Provincia de Manabí), se siguió un procedimiento meticuloso para la descongelación del ADN enfocado en maximizar su preservación y también para evitar una potencial contaminación cruzada del material genético entre las muestras evaluadas.

Para la inoculación del ADN en los tubos se escogió una de las tres alícuotas (alícuota A) de cada muestra. Para la descongelación gradual se colocó los en un bloque frío, al cual previamente se lo limpió y desinfectó con alcohol al 70% y HCl 0.1M. Luego se lo introdujo en un cooler de poliestireno cerrado, limpió y desinfectado; mientras se realizó la preparación del Master Mix.

El Master Mix de la reacción de PCR en Tiempo Real se preparó para un volumen de reacción de 10 μ L con 1 μ L de ADN de muestra (Tabla 3 y 4). Es necesario preparar dos master mixes, uno empleando los primers A y B, y el otro con los primers C y D. De esta manera, cada una de las muestras se evaluó la presencia de los fragmentos AB y CD del gen 16S del ARN ribosomal de *Leptospira*. Para evitar confusiones cada PCR strip fue rotulado con AB o CD para identificar los primers empleados, y con números romanos (ej. I, II, III, etc.) para determinar el orden en el costado frontal del tubo 1 de cada strip. En el último tubo de cada grupo de muestras tanto en AB como en CD, se rotuló con (+) y con (-) los respectivos tubos de los controles positivo y negativo.

Para la carga del ADN, se colocó el strip AB contiguo al strip CD con el mismo número romano, de tal manera que cada muestra de suero sea cargada su ADN tanto en AB como en CD seguidamente. Antes de abrir los tubos con las alícuotas de ADN, se las sometió a una pequeña centrifugación (spin) para garantizar que no hubiese gotas alrededor de la tapa. Previo a la inoculación se limpió la pipeta con alcohol al 70% y su punta con HCl 0.1 M. Se prosiguió de la siguiente manera: se recogió 1 μ L de ADN cuidadosamente de la alícuota. Luego se colocó el 1 μ L de ADN en el tubo de strip AB respectivo. Posteriormente, se volvió a coger 1 μ L de ADN para colocarlo en su contraparte CD respectiva. Este procedimiento se repitió por cada muestra, incluso con el control positivo. El control negativo solo contenía el master mix, para eliminar el riesgo de una

contaminación cruzada de ADN. Finalmente, los strips fueron tapados con el strip de tapas comenzando por el control negativo, para evitar su contaminación.

Los PCR strips fueron distribuidos simétricamente en la superficie de la platina del termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR BioRad. Se programó el protocolo de amplificación: denaturación inicial a 95° C por 3 minutos, denaturación en ciclo de 95° C por 30 segundos, anclaje (annealing) a 62.5° C por 30 segundos, extensión a 72° por 30 segundos; durante 45 ciclos, denaturación de primer dimer a 80° C por 30 segundos. Finalmente, Melting Curve desde 65° C a 95° C con una rampa de 0.5° C cada 5 segundos.

Después de la corrida, los strips fueron rotulados con la fecha de procesamiento a lo largo de las tapas de los tubos strips. Los amplicones se almacenaron a 4° C en orden cronológico.

7.8. Identificación y selección de los sueros sanguíneos positivos a *Leptospira spp.* en PCR en tiempo real.

Una vez realizada la amplificación de AB y CD en las muestras mediante PCR en Tiempo Real, se analizaron los resultados de cada muestra tanto de AB como de CD, se enfocó principalmente en sus respectivas temperaturas de melting. De cada tanda, se identificaron los amplicones de las muestras que generaron temperaturas de melting superiores a 81° C tanto para AB como para CD. Posteriormente, se rotularon sus códigos en el respectivo tubo del strip para lo cual se guió por el orden del archivo de corrida generados; para determinar cuáles amplicones deberán usarse en la reamplificación respectiva de AB y CD en PCR convencional.

7.9. Reamplificación de AB y CD mediante PCR.

Los amplicones seleccionados de la amplificación de AB y CD en PCR Tiempo Real fueron sometidos a una reamplificación, de sus respectivos fragmentos, en PCR convencional para aumentar su concentración y pureza para su posterior secuenciación.

Para la reamplificación se trabajó con un volumen total de reacción de 20 μ L. Los reactivos empleados fueron: 1X de GoTaq® Flexi Buffer Promega™, 2mM de Solución de MgCl₂, 200 μ M de PCR Nucleotide Mix Promega™, 1 μ M de primers (tanto A y B como C y D, respectivamente), 0.02U/ μ L de GoTaq® DNA Polimerase Promega™ y Agua grado PCR para aforar a 18.5 μ L. Por cada reacción de reamplificación se usó 1.5 μ L de amplicón de las muestras de suero amplificadas en PCR en Tiempo Real, para sus respectivos fragmentos AB y CD (Tabla 5).

Antes de cargar los amplicones se seleccionaron los tubos en sus respectivos strips. Para evitar la contaminación entre amplicones al momento de destapar los strips se recortaron las tapas del tubo a abrirse. La cargada de los amplicones se la realizó en un área alejada (área negra) del área de elaboración del master mix, de acuerdo a las normativas del Laboratorio del Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito. La punta de la pipeta empleada se limpió con HCl 0.1M para eliminar cualquier rastro de amplicón contaminante.

Las condiciones de reamplificación fueron las siguientes: Denaturación inicial a 94°C por 3 minutos, denaturación en ciclo 94°C por 1 minuto, anclaje de primers (annealing) 63° C por 1 minuto con 30 segundos, extensión a 72° C por 2 minutos durante 29 ciclos; elongación final 72° C por 10 minutos y pausa de 12° indefinidamente. Este

programa de amplificación fue usado para AB y CD; los cuales se ejecutaron conjuntamente para cada muestra.

Los amplicones de la reamplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de Agarosa al 1.5% con 70V por 50 minutos teñido con Bromuro de Etidio; para lo cual se empleó 5µL de amplicón. Se fotografió el gel expuesto a luz Ultravioleta y se analizó la imagen para identificar las bandas de 333pb para AB y 292 pb para CD tanto específicas como indefinidas. Posteriormente, se seleccionaron las muestras que presentaron las bandas, se las codificó para su envío y secuenciación.

7.10. Secuenciación de amplicones reamplificados en PCR

Los tubos con los amplicones reamplificados y seleccionados fueron empacados y enviados por correo convencional a las instalaciones de Funcional Biosciences, Inc., para su secuenciación. Se realizaron en total tres órdenes en la cuenta del laboratorio: 1) la 17579 para 50 amplicones de sueros humanos del INSPI – Guayaquil (fueron 100 secuenciación tanto en Forward como en Reverse), 2) la17981 para 75 amplicones de sueros humanos del INSPI-Portoviejo y 3) la 18000 para 4 tanto del INSPI-Portoviejo como INSPI Guayaquil.

Después de una semana, los archivos de secuenciación de los amplicones fueron descargados de la cuenta del laboratorio en la página de Funcional Biosciences. El nombre de los archivos fueron: 1) BioI-3472_Trueba_17579.zip, 2) BioI-3544_Trueba_17981.zip y 3) BioI-3544_Trueba_18000.zip, respectivamente.

7.11. Obtención de secuencias consensos e identificación

Los resultados de las secuenciaciones de los amplicones fueron analizados con el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA5). El proceso para la obtención de la secuencia consenso de cada muestra consistió en verificar y completar la secuencia tanto de A y/o C (forward) como de B y/o D (reverse) del respectivo amplicón, para lo cual se empleó las herramientas “Sequence Editor” y “Alignment” conjuntamente. Con la primera se verificó la magnitud de los picos de los respectivos nucleótidos en cada posición asignada con “N”, se determinó el nucleótido adecuado en dicha posición. Finalmente con la segunda, se asignó el nucleótido correcto para completar la secuencia del secuenciación. Esto se realizó tanto para la secuencia forward como para la reverse con cada amplicón en un solo archivo de secuenciación.

Después de obtener las secuencias completas (forward y reverse por cada amplicón), se realizó un alineamiento empleando la función “Clustal”, con los parámetros por defecto, de la herramienta “Alignment”. Seguidamente, se construyó una secuencia consenso preliminar, para lo cual se agregó las secuencias únicas tanto de la forward como de la reverse a la secuencia homóloga de ambas. Con esta secuencia mixta se realizó una búsqueda para obtener la identidad bacteriana, para lo cual se usó la función “Go BLAST”. Se obtuvieron los resultados de la búsqueda con lo cual se evaluó el porcentaje de homología así como el porcentaje de cobertura de la secuencia indagada. Al obtener un porcentaje menor al 100% de la cobertura, se prosiguió a identificar la posición de los nucleótidos entre los cuales la secuencia indagada poseía homología con la secuencia más idéntica disponible en la base de datos del GenBank. Hecho esto se eliminaron, de la secuencia consenso preliminar, los nucleótidos en exceso; y se volvió a hacer un BLAST y verificar el aumento en el porcentaje de cobertura.

Así mismo si la secuencia no disponía de un porcentaje elevado en la homología; se importó, al archivo de alineamiento, la secuencia “Subject” más afín encontrada en el BLAST. Se hizo un nuevo alineamiento con el “Clustal”, con las secuencias Forward y Reverse, la secuencia mixta preliminar y la secuencia “Subject” para identificar la posición de las discrepancias (SNPs y Gaps) con esta última. Las discrepancias fueron nuevamente evaluadas al comparar los picos de los nucleótidos conjuntamente en los dos archivos de secuenciación. De esta manera se confirmó y/o rectificó los nucleótidos asignados a la secuencia consenso preliminar.

Estos dos procesos finalmente permitieron obtener las secuencias consensos de todas las muestras reamplificadas. Con las secuencias consensos se realizaron búsquedas en BLAST y se determinaron las identidades de las especies de *Leptospira* encontradas, junto con su porcentaje de homología y presencia de SNPs.

7.12. Diseño y evaluación del primer R Inter.

Se realizó un alineamiento general con 101 secuencias del gen 16S ARN ribosomal (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (región amplificada por los primers AB y CD) de *Leptospira*: patógenas, intermedias y saprófitas, de especies: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. santarosai*, *L. weilli*, *L. genospecies 2*, *L. alexanderi*, *L. noguchii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. broomii*, *L. wolffii*, *L. meyeri*, *L. kmetyi*, *L. biflexa* y *L. wolbachii* (Tabla 5), en MEGA 5.

Se identificó una región única para especies intermedias (Figura 1); en base a la cual se diseñó un primer, denominado Int: 5'-TCT TTA CCT ATC ARA TCY TGT GAT CCA-3', para que amplifique las especies intermedias tanto con primer A como con el primer C (bandas de 160 pb y 143 pb, respectivamente) (Figura 2). La especificidad de este

primer fue probada utilizando 37 muestras de ADN de *Leptospira*: 7 patógenas de referencia (Tabla 1), 21 patógenas del cepario USFQ (Anexo 1), 5 intermedias de referencia y 4 saprofíticas de referencia (Tabla 1).

8. Resultados

8.1. Estandarización de Real Time PCR para primers AB y CD

Los gradientes realizados para la estandarización de la amplificación en PCR en tiempo real de los fragmentos AB y CD permitieron determinar la temperatura de anclaje (T_a) adecuada para un óptimo rendimiento. En el gradiente de la PCR con los primers A y B (fragmento AB) (Figura 3) todas las muestras evaluadas comenzaron sus amplificaciones en promedio en el ciclo de cuantificación (C_q) 15 (Anexo 2). Pero, la curva de la temperatura de anclaje de 62.5°C fue la que más temprano inició la amplificación del fragmento AB en el C_q 14,9.

En función de su fluorescencia relativa (RFU), las curvas o temperaturas de anclaje con mayor rendimiento fueron: la de 64.6°C con 340 RFU, 62.5°C con 315 RFU y 59.4°C con 310 RFU (Figura 3). En la gráfica de picos de denaturación (melting), se determinó dos temperaturas de denaturación (T_m); 86°C para el fragmento AB de *L. interrogans* serovar Hebdomadis en todas las curvas, y 74.5°C para los dímeros de primer de AB. En esta misma gráfica, las 3 curvas con los picos más altos fueron: 59.4°C , 62.5°C y 58°C .

Adicionalmente, se realizó la electroforesis de los amplicones obtenidos del gradiente AB en PCR en Tiempo Real. Los amplicones obtenidos con temperaturas de anclaje (T_a) desde 58°C hasta 63.9°C produjeron bandas claras y del tamaño esperado del fragmento (333pb); mientras que las muestras con T_a de 64.2°C y 65°C presentaron bandas tenues y delgadas, lo que evidenció una diferencia significativa en el producto de ADN amplificado (Anexo 3). El gel mostró que la temperatura con un mayor producto amplificado se generó con una temperatura de anclaje de 60°C . Sin embargo, la T_a de 62.5°C tiene un buen rendimiento de amplificación con menos cantidad de subproducto (banda secundaria a 200pb) que las demás temperaturas.

Para la PCR con los primers C y D (fragmento CD) también se realizó un gradiente para su temperatura de anclaje (T_a). El ciclo de cuantificación (C_q) promedio se dio aproximadamente en el ciclo 22 (Anexo 4). La temperatura de anclaje de 62.5°C fue la que más temprano inició la amplificación del fragmento con un C_q de 21,71. En la gráfica de amplificación obtenida (Figura 4) indicó que las temperaturas de anclaje con mayor fluorescencia relativa (RFU) fueron 62.5°C con 300 RFU, 58°C con 290 RFU y 60.8°C con 280 RFU.

La temperatura de denaturación (T_m) para el fragmento CD de *L. interrogans* serovar Pyrogenes fue 86°C y para los dímeros de primers 76°C (Figura 4 y Anexo 4). Los picos con mayor altura ocurrieron a 62.5°C , 60.8°C y 58°C . Finalmente, la electroforesis de la amplificación con los primers C y D generó una banda de 292pb con similar intensidad en todas las temperaturas de anclaje (T_a) (Anexo 5). Se determinó que la temperatura de anclaje adecuada para las PCR con primers A-B y C-D es de $62,5^\circ\text{C}$ y la temperatura de denaturación de los fragmentos AB y CD es de 86°C . Para las muestras clínicas se determinó que productos con T_m s superiores a 80°C - 81°C se les consideraría positivos.

8.2. Sensibilidad de AB/CD de PCR en Tiempo Real y PCR Convencional.

Los resultados de sensibilidad de los primers AB se muestran en la Figura 5. El fragmento amplificado con primers AB fue detectado hasta la dilución de $1 \times 10^{-8}\text{ng/mL}$, con un C_q (Ciclos de cuantificación) en el ciclo 37,57 (Anexo 6). La temperatura de denaturación (T_m) para las diluciones no fue la misma, a pesar de tener la misma secuencia de ADN. Ésta disminuyó significativamente a concentraciones bajas de ADN. Se obtuvo una regresión lineal para las diluciones amplificadas con AB, R^2 de 0,977 (Figura 5). En

PCR convencional, el fragmento AB fue amplificado hasta la dilución 1×10^{-4} ng/mL (Figura 6).

Los resultados de sensibilidad para el fragmento CD se presentan en la Figura 7. La amplificación de CD fue detectada en todas las diluciones, inclusive hasta 1×10^{-8} ng/mL, con un Cq de 31,65 (Anexo 7). La amplificación para CD generó un patrón de 2 picos de denaturación (con 2 temperaturas de denaturación), en todas las diluciones. Desde la dilución 1.29×10^1 ng/mL a la dilución 1×10^{-4} ng/mL hubo dos valores de Tm con $82,5^\circ \text{C}$ y 86°C ; y desde la dilución 1×10^{-5} ng/mL a la 1×10^{-8} ng/mL, con el control negativo (C-) fueron de $75,5^\circ \text{C}$ y 84°C indicando la presencia de dímeros de primers.

La sensibilidad en la amplificación de los fragmentos AB y CD es mucho mayor en PCR en tiempo real respecto a la PCR convencional. Para AB, la PCR en tiempo real es más sensible que su contraparte convencional en 4 órdenes de magnitud; debido a que amplificó hasta con 1×10^{-8} ng/mL de ADN de interés (Figura 5 y Anexo 6), mientras que la convencional solo amplificó hasta 1×10^{-4} ng/mL (Figura 6). A pesar que no se registraron las diluciones 1×10^{-5} ng/mL, 1×10^{-6} ng/mL y 1×10^{-7} ng/mL, esto no afectó que se haya podido determinar que la sensibilidad para el fragmento AB sea de 1×10^{-8} ng/mL. La curva estándar permite llegar a esta conclusión debido a que la mencionada dilución cae dentro de la regresión lineal calculada (Figura 5).

La sensibilidad en PCR en Tiempo Real para el fragmento CD también es superior a su contraparte convencional; se amplificó el ADN de interés hasta la concentración de 1×10^{-5} ng/mL (Figura 8 y Anexo 7), dos órdenes de magnitud más bajo que la convencional con 1×10^{-3} ng/mL (Figura 9). A pesar que CD en PCR en tiempo real generó señal hasta la dilución 1×10^{-8} ng/mL, por medio de la curva estándar se determinó que hasta

1×10^{-5} ng/mL es confiable porque hasta esta dilución la regresión lineal recoge todos los puntos (Figura 8). La fluorescencia del resto de diluciones no es confiable debido a que no pertenece al fragmento CD amplificado sino a la formación de dímeros de primers, lo que se manifiesta en la desproporcionalidad y desvío en la regresión lineal de la curva estándar completa (Figura 7).

8.3. PCR en Tiempo Real de AB y CD en muestras clínicas de suero humano.

Se procesó 254 muestras de suero sanguíneo humano, de las cuales 154 fueron del INSPI-Guayaquil y 100 muestras de Portoviejo; 66 del INSPI-Portoviejo y 34 de la Clínica San Antonio del IESS de Portoviejo.

De las 154 muestras procesadas del INPI-Guayaquil, 45 (29,2 %) amplificaron para AB y/o CD; 25 amplificaron con AB (16,2%), 27 con CD (17,5%), 7 en las dos reacciones de primers (4,5%) y 109 fueron negativas (70,8%) (Anexo 8 y Tabla 6).

De las 100 muestras de Portoviejo, 75 (75%) amplificaron para AB y/o CD; 31 amplificaron con AB (31%), 59 con CD (59%), 15 amplificaron en las dos reacciones de primers (15%) y 25 fueron negativos (25%) (Tabla 7 y Anexo 9).

8.4. Secuenciación de amplicones

Las muestras positivas en PCR en tiempo real se reamplificaron en PCR convencional (Tabla 5), para los respectivos fragmentos AB y CD. De las 45 muestras del INSPI-Guayaquil positivas a *Leptospira* (Anexo 8), 40 produjeron bandas con el tamaño esperado en la reamplificación (Anexo 10 y 11). En las muestras de suero (n = 100) de Portoviejo, 75 muestras fueron positivas a *Leptospira* (Anexo 9) amplificando AB y/o CD. De estas muestras, solo 34 generaron la banda del fragmento AB y ninguna generó fragmento CD en la reamplificación (Anexo 12 y 13). El resto de muestras, tanto en

Guayaquil como en Portoviejo, a pesar de haber producido picos de melting con T_m superiores a 81°C no generaron las bandas deseadas o mostraron bandas inespecíficas en la reamplificación. Por esta razón, estas muestras no fueron enviadas a secuenciación.

Los amplicones con tamaños esperados ($n = 84$) fueron sometidos a secuenciación en los dos sentidos. De las muestras de Guayaquil se analizó 50 amplicones, de los cuales 38 amplicones, pertenecientes a 32 muestras, mostraron secuencias homologas a *Leptospira* (Anexo 14); 33 (66%) *L. wolffii*, 2 (4%) *L. borgpetersenii*, 1(2%) *L. interrogans* (Tabla 6). En una muestra se amplificó *L. wolffii* (con primers AB) y *L. borgpetersenii* (con primers CD) (Figura 10, Anexo 15, 16 y 17). De los 34 amplicones reamplificados (pertenecientes a 34 sueros) con AB y CD de Portoviejo, se identificó secuencias de *Leptospira* en 12 (Tabla 7 y Anexo 18); 11(91.7%) *L. wolffii* y 1 (8.3%) *L. licerasiae* (Figura 11, Anexo 19 y 20).

8.5. Diseño del Primer específico para leptospiras pertenecientes al grupo Intermedio

A partir del alineamiento general de secuencias del gen 16S ARN ribosomal de especies de *Leptospira* (Tabla 2), se identificó una región única para las especies Intermedias entre la posición 132 y la 155 (Figura 1). A partir de la cual se diseñó un primer degenerado (Int), específico para *Leptospira* intermedia, con una secuencia de 27 bases: 5'-TCT TTA CCT ATC ARA TCY TGT GAT-3'. Las características físicas del primer Inter determinaron que es idóneo para emplearse en pareja tanto con el primer A como con el primer C, generando fragmentos de 160pb y 143pb respectivamente (Figura 2).

El primer Int mostró ser específico para el grupo Intermedio (Tabla 8) al usarse en conjunto con los primers A y C. Para este fin se lo diseñó degenerado para que abarque la

secuencia de todas las especies intermedias en el locus de interés; y se le agregó algunos nucleótidos extras para que la temperatura de anclaje sea similar con los primer A y C, para emplear no solo el mismo programa de amplificación sino la misma concentración de reactivos (Tabla 9) que AB y CD.

Al evaluar el desempeño del primer Int (Figura 12, 13 y 14), con ADN de *Leptospira spp.*, se obtuvo que amplifica específicamente el ADN de especies intermedias de *Leptospiras* (Tabla 8). Adicionalmente, se probó el primer Int con muestras clínicas de suero humano procedentes de Portoviejo, al reamplificar los fragmentos A-Int y C-Int en los amplicones de PCR en tiempo real (Anexo 9). De los 33 amplicones reamplificados (Anexo 21) y secuenciados (Tabla 10) se identificó *Leptospira* intermedia en 26 de ellos pertenecientes a 23 muestras (Anexo 22); 3 (9,1%) *L. wolffii*, 7 (21,2%) *L. wolffii-inadai*, 14 (42,4%) *L. wolffii-licerasiae*, 1(3%) *L. inadai* y 1 (3%) *L. interrogans* (Tabla 10, Anexo 23, 24 y 25).

Al reamplificar con el primer Int los amplicones de PCR en tiempo real de los sueros de Portoviejo, se observó un incremento a 25 el número de sueros que se identificaron (Tabla 11), respecto a los 12 sueros obtenidos con AB y CD (Tabla 7), porque se pudo reamplificar y secuenciar tanto los fragmentos A-Int como los C-Int (Anexo 21).

El primer Int es específico para las leptospiras del grupo intermedio, ya que generó reamplificación del fragmento C-Int (Anexo 21) en comparación a los barridos obtenidos con la reamplificación de CD (Anexo 13) a partir de los mismos amplicones. Al ser más específico el primer Int con el ADN de interés, se consiguió reamplificar únicamente el ADN de leptospiras intermedias. Como evidencia las bandas esperadas de 143pb se

amplificaron. Por otro lado, el barrido obtenido con reamplificación CD se explicaría por la homología parcial del primer D con secuencias de ADN contaminante presente en los sueros sanguíneos. Cabe mencionar que la contaminación también se evidenció en la reamplificación con C- Int, porque se generaron bandas inespecíficas. Con las muestras de Guayaquil no se realizaron reamplificaciones utilizando el primer Int debido a que se desecharon los amplicones de PCR en tiempo real. Lastimosamente, la idea de reamplificar los amplicones de la PCR en tiempo real utilizando el primer Int, se concibió luego de haber desechado los amplicones de las muestras de Guayaquil. Y el volver a amplificar en PCR en tiempo real no fue posible por el costo elevado del reactivo SsoFast™ EvaGreen® Supermix BioRad™.

9. Discusión

La leptospirosis es considerada un problema de salud pública (Bharti, 2003) debido a que es una de las zoonosis de mayor distribución a nivel mundial (Turner L. , 1970). Puede alcanzar rangos de mortalidad desde el 3% al 70% que varían en función de las manifestaciones clínicas (World Health Organization, 2003). Por lo cual es necesario un diagnóstico temprano de la enfermedad para evitar que infecciones severas de *Leptospira* avancen hasta su desenlace mortal (Brown, 1995). La PCR es un método de diagnóstico que permite identificar ADN de *Leptospira* en muestras clínicas de pacientes infectados (Gravekamp, 1993). Y ha demostrado ser un método rápido, sensible y específico para detectar infecciones de *Leptospira* (Brown, 1995).

En este estudio encontramos que 75% de pacientes febriles en Portoviejo (Tabla 7) y un 29,2% de pacientes febriles en Guayaquil fueron positivos a leptospirosis con la prueba de PCR en tiempo real. La diferencia en los porcentajes de positividad de las dos localidades probablemente responde al tipo de muestras procesadas. Los sueros sanguíneos de Portoviejo provinieron de individuos febriles serológicamente positivos a leptospirosis, mientras que los sueros sanguíneos de Guayaquil provinieron de individuos febriles negativos a dengue.

La identificación de las muestras de suero provenientes de Guayaquil (87,5%) (Tabla 6) y Portoviejo (91,7%) (Tabla 7) mostró alta homología a *Leptospira wolffii* (Anexo 15 y 19). Esto sugiere que la *Leptospira wolffii* (*Leptospira* del grupo intermedio) pudo haber sido la *Leptospira* predominante en esta región en los meses evaluados del 2011, 2012 e inicios del 2013 (Anexo 14,18 y 22). En Portoviejo, también se encontró amplicones con secuencias similares a especies intermedias, *L. licerasiae* (Tabla 7 y Anexo

20). Estos datos coinciden con resultados obtenidos por otros investigadores quienes también encontraron evidencia de infección febril humana causada por leptospiras del grupo intermedio (Levett P. M., 2006) (Chappel, 1998) (Arzouni, 2002) (Petersen, 2001). También se encontró secuencias pertenecientes al grupo patógeno en porcentajes menores; en Guayaquil se encontró *L. borgpetersenii* en un 6,25% (Anexo 16) y *L. interrogans* (Anexo 17) en un 3,13%, respecto a los sueros identificados (Tabla6). Esto evidencia que en cada uno de los lugares estudiados existieron diferencias en las leptospiras circulantes que están afectando a la población humana. Es posible que diferentes especies de *Leptospiras* podrían variar en estas dos zonas y que existen factores que favorecen la proliferación de una especie de *Leptospira* en particular.

En la actualidad se dispone de versiones de PCR que permiten reducir el tiempo de procesamiento y aumentar la sensibilidad en el diagnóstico, tal es el caso de la PCR en tiempo real. Respecto a la leptospirosis, ya existen propuestas que emplean esta técnica (Bourhy, 2011). Para la detección de *Leptospira* se han empleado comúnmente los genes *rss* ARNr 16S (Merién, 2005), *lipl32* (Thaipadunpanit, 2011) y *secY* (Ahmed A. E., 2009) (Ahmed A. A., 2012).

En este estudio también pudimos desarrollar un método de PCR simple para diferenciar el tipo de *Leptospira*, tanto en grupo como en especie, que se encuentra en una muestra clínica. Hasta el momento las propuestas que se disponen para determinar las especies de *Leptospira* únicamente se enfocan en la identificación de especies patógenas (Ahmed A. E., 2009) (Merién, 2005). Con el primer Int, se genera una nueva propuesta que permite identificar con exclusiva especificidad a las cinco especies de *Leptospira* perteneciente al grupo intermedio. Hasta el momento se lo puede usar en PCR convencional, conjuntamente en la amplificación de los fragmentos AB y CD del gen

ARNr 16S (Mérien F. A., 1992). Sin embargo, el primer Int se perfila como un candidato idóneo para emplearse en modalidades más sofisticadas de PCR en tiempo real, como lo es la tecnología TaqMan®.

La técnica de PCR se usó para detectar la presencia del patógeno *Leptospira* en suero sanguíneo de pacientes febriles. Para esto se adaptó la PCR convencional, desarrollada por Meriën *et al.* que amplifica los fragmentos AB y CD del gen ARNr 16S (1992), a una versión en PCR en tiempo real. Se seleccionó esta PCR debido a que ha demostrado ser muy sensible y específica para detectar bacterias del género *Leptospira* en muestras clínicas (Baquero, 2010).

La PCR en tiempo real dispone de mayor sensibilidad, por lo que permite detectar el ADN de *Leptospira* en muestras clínicas con infección aguda (Ahmed A. E., 2009), lo que permite un diagnóstico temprano con mayor certeza. Los resultados de este estudio muestran que la prueba de PCR en tiempo real seguida de la secuenciación permite obtener información muy valiosa con respecto a la presencia de leptospirosis en una población. Como muestran los resultados, hubo un mayor porcentaje de sueros sanguíneos positivos para *Leptospira* en Portoviejo respecto a Guayaquil. Lo que indica, que en las parroquias rurales del Cantón Portoviejo existe una elevada positividad de leptospirosis en la población humana.

Como se ha demostrado en este y otros trabajos (Levett P. M., 2006) (Chappel, 1998) (Arzouni, 2002) (Petersen, 2001), las infecciones con leptospiras del grupo intermedio ocurren en humanos. Pero en este estudio en particular, el ADN de *L. wolffii* se encontró en altos porcentajes en poblaciones humanas. Este procedimiento es muy importante ya que permite diferenciar si la leptospirosis es causada por leptospiras del

grupo patógeno o del grupo intermedio; lo cual es de mucha utilidad clínica y epidemiológica. Es así que se dispone de una metodología nueva para la identificación de especies intermedias de *Leptospira*.

\

10. Conclusiones

- Hay un alto porcentaje de positividad tanto en Guayaquil como en Portoviejo de *Leptospira wolffii*.
- Los porcentajes de positividad de ADN de *Leptospira* entre Guayaquil y Portoviejo causada por una *Leptospira* intermedia es diferente; presentando Portoviejo un mayor porcentaje de muestras positivas. La PCR en tiempo real para AB y CD es adecuada para la identificación de *Leptospira* en muestras clínicas de sueros sanguíneos humanos.
- Este es un nuevo método permite detectar *Leptospira* intermedia.
- El primer Int permite la identificación específica de las 5 especies Intermedias de *Leptospira*.
- El método para la identificación de *Leptospira spp.* en muestras de suero sanguíneo sirve para determinar con precisión cuál es la especie del agente etiológico en la leptospirosis. Por lo cual, este método podría emplearse como una herramienta epidemiológica porque puede rastrear al patógeno a lo largo de su ciclo epidemiológico. Así mismo, puede aplicarse como un método de diagnóstico más minucioso.
- Las muestras clínicas de suero sanguíneo de Guayaquil permitieron obtener amplicones de mejor calidad.
- La adaptación en PCR en tiempo real para la amplificación de los fragmentos AB y CD se consiguió mediante su estandarización con una temperatura de anclaje (Ta) de 62° C y 45 ciclos de amplificación para ambos fragmentos.

- La PCR en tiempo real de AB y CD es más sensible que la contraparte convencional, ya que amplificó 4 órdenes de magnitud menor la concentración de ADN de *Leptospira* con los primers AB y 2 órdenes de magnitud menor la concentración de ADN de *Leptospira* con los primers CD.
- Es necesaria la respectiva reamplificación de los amplicones de AB y CD obtenidos en PCR en tiempo real para conseguir un buen producto para la secuenciación e identificación de las especies de *Leptospira*.
- La metodología establecida en este trabajo consiste en: amplificación de AB y CD en PCR en tiempo real, reamplificación en PCR convencional, secuenciación e identificación en BLAST.

11. Recomendaciones

- Disponer de procedimientos más asépticos al momento de la obtención del suero sanguíneo humano, para evitar la contaminación de las muestras con bacterias ambientales que afecten los resultados de la metodología propuesta. Por lo que se tiene que capacitar al personal responsable para reducir el ruido provocado por la contaminación.
- Mejorar la eficiencia de la metodología utilizando técnicas moleculares más sensibles como la tecnología TaqMan®.
- Aprovechar la especificidad del primer Inter en la identificación de leptopiras intermedias, para diseñarlo como sonda y mejorar la sensibilidad para detectar especies intermedias de *Leptospira*.
- Ejecutar la metodología de identificación de especies de *Leptospira* en muestras frescas con poco tiempo de almacenamiento para evitar la degradación del ADN bacteriano.
- Aplicar la metodología en otro tipo de muestras clínicas que presentan mayor cantidad de ADN de *Leptospira* como en orina y en tejido infectados.
- Aplicar esta metodología como una herramienta epidemiológica que permita comprender la dinámica de la Leptospirosis en el Ecuador para su mejor control.

12. Referencias Bibliográficas

- Abdulkader, R. (1997). Acute renal failure in leptospirosis. *Ren Fail*(19), 191-198.
- Ahmed, A. A. (2012). *Molecular approaches in the detection and characterization of Leptospira*. Amsterdam: Ridderprint BV-Ridderkerk.
- Ahmed, A. E. (2009). Development and Validation of a Real-Time PCR for detección fo Pathogenic Leptospira species in clinica materials. *PLoS One*, e7093.
- Arzouni, J. P. (2002). Human infection caused by Leptospira fainei. *Emerg. Infect. Dis.*(8), 865-868.
- Baquero, M. L. (2010). Evaluation of a Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Leptospira in Cattle. *The Open Veterinary Science Journal*(4), 31-35.
- Bharti, A. N. (December de 2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet: Infectious Diseases*, 3, 757-771.
- Boilin, C. a. (1988). Human-to-human transmission of Leptospira interrogans by milk. *J. Infect. Dis.*(158), 246-247.
- Bourhy, P. B. (2011). Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic Leptospira spp. in blood and identification of variations in target sequences. *J. Clin. Microbiol.*(49), 2154-2160.
- Brown, P. G. (1995). Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J. Med. Microbiol.*(43), 110-114.
- Bunnell, J. H. (2000). Detection of pathogenic Leptospira spp. infetions among mammals captured in the Peruvian Amazon Basin region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*(63), 225-228.

- Chappel, R. K. (1998). Serological titres to *Leptospira fainei* serovar hurstbridge in human sera in Australia. *Epidemiol. Infect.*(121), 473-475.
- Colagross-Schouten, A. M. (2002). Diagnosis and seroprevalence of leptospirosis in California sea lions from coastal California. *J. Wildl. Dis.*(38), 7-17.
- Cousins, D. E. (1989). Evidence for sheep as a maintenance host for *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Vet. Rec.*(124), 123-124.
- Cumberland, P. E. (1999). Assessment of the efficacy of an IgM-elisa and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 731-734.
- Ellis, W. L. (1978). Antibodies to leptospira in the sera of aborted bovine foetuses. *Vet. Rec.*(103), 237-239.
- Faine, S. (1994). *Leptospira and leptospirosis*. London: CRC Press.
- Farr, R. (1995). Leptospirosis. *Clin. Infect. Dis.*(21), 1-8.
- Gravekamp, C. v. (1993). Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. *J. Gen. Microbiol.*(139), 1691-1700.
- Ko, A. G. (October de 2009). *Leptospira*: the dawn of the moleculargenetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature*, 7(Reviews), 736-747.
- La Scola, B. B. (2006). Partial rpoB gene sequencing for identification of *Leptospira* especies. *FEMS Microbiol. Lett.*(263), 142-147.
- Levett, P. (2011). *Leptospira*. En J. C. Versalovic (Ed.), *Manual of Clinical Microbiology* (Vol. 1, págs. 916-923). Washington, DC: ASM Press.
- Levett, P. M. (2006). *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*(56), 671-673.

- Little, T. H. (1992). Control of *Leptospira hardjo* infection in beef cattle by whole-herd vaccination. *Vet. Rec.*(131), 90-92.
- Mandigan, M. M. (2008). *Brock: Biología de los Microorganismos* (10° ed.). Madrid: Pearson Prentice Hall.
- Manock, S. J. (2009). Etiology of acute undifferentiated febrile illness in the Amazon basin of Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*(81), 146-151.
- Matthias, M. L. (2002). Leptospiral carriage by mice and mongoose on the island of Barbados. *West Indian Med.*(51), 10-13.
- Meites, E. J.-J. (2004). Reemerging Leptospirosis, California. *Emerg. Infect. Dis.*(10), 406-412.
- Mérien, F. A. (Sept de 1992). polymerase Chain Reaction for Detection of *Leptospira* spp. in Clinical Samples. *journal of Clinical microbiology*, 2219-2224.
- Mérien, F. A. (Sept de 1992). Polymerase Chain reaction for Detection of *Leptospira* spp. in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 2219-2224.
- Merien, F. B. (1995). Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *J. infect. Dis.*(172), 281-285.
- Merián, F. P.-A. (2005). A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiology Letters*(249), 139-147.
- Monrey, R. G. (2006). Species-specific identification of *Leptospiraceae* by 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.*(44), 3510-3516.
- Perolat, P. C. (1998). *Leptospira fainei* sp. nov., isolate from pigs in Australia. *International Journal of Systemic Bacteriology*(48), 851-858.

- Petersen, A. B. (2001). First isolation of *Leptospira fainei* serovar Hurstbridge from two patients with Weil's syndrome. *J. Med. Microbiol.*(50.), 96-100.
- Saito, M. V. (2012). *Leptospira idonii* sp. nov., isolated from environmental water in Fukuoka, Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, doi:10.1099/ijs.0.047233-0.
- Sehgal, S. S. (2000). Randomised controlled trial of doxycycline prophylaxis in an endemic area. *Int. J. Antimicrob. Agents*(13), 249-255.
- Slack, A. S. (2006). Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiol.*(6), 95.
- Sulzer, C. (1975). *Leptospiral serotype distribution lists according to host and geographic area July 1966 to July 1973*. Atlanta: US Department of Health, Education, and Welfare.
- Thaipadunpanit, J. C. (2011). Diagnostic accuracy of Real-Time PCR assays targeting 16S rRNA and lipL32 for Human Leptospirosis in Thailand: A case-control study. *PLoS One*, e16236.
- Tomich, P. (1979). Studies of leptospirosis in natural host populations I. Small mammals of Waipio Valley, island of Hawaii. *Pacific Science*(33), 257-259.
- Torten, M. S. (1973). A new leptospiral vaccine for use in man. II. Clinical and serological evaluation of a field trial with volunteers. *J. infect. Dis.*(128), 647-651.
- Turner, L. (1968). Leptospirosis II. Serology. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 880-889.
- Turner, L. (1970). Leptospirosis III. Maintenance, isolation and demonstration of leptospire. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*(64), 623-646.

- Victoria, B. A. (2008). Conservation of the S10-spc- α locus within otherwise highly plastic genomes provides phylogenetic insight into the genus *Leptospira*. *PLoS One*(3), e2752.
- Vijayachari, P. S. (2001). Evaluation of darkground microscopy as a rapid diagnostic procedure in leptospirosis. *Indian J. Med. Res.*, 114, 54-58.
- Vijayachari, P. S. (November de 2008). Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J. Biosci.*, 557-569.
- Waitkins, S. (1987). *Leptospirosis; in Manson's tropical diseases*. (19 ed.). (P. M.-B. Bell, Ed.) London: Baillière Tindall.
- World Health Organization, W. (2003). *Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control*.

13. Tablas

Tabla 1. Listado del ADN referencial de *Leptospira spp.*, identificadas molecularmente, enviadas por el Dr. Rudy Hartskeerl del National Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Amsterdam – Holanda.

Subgrupo	Numeración Ref.	Especie	Cepa
Intermedia	1	<i>L. broomii</i>	5399
	2	<i>L. fainei</i>	BUT 6
	3	<i>L. inadai</i>	10
	45	<i>L. licerasiae</i>	VAR010
	11	<i>L. wolffii</i>	Korat-H2T
Patógena	4	<i>L. interrogans</i>	Lai
	5	<i>L. interrogans</i>	Swart
	6	<i>L. kirschneri</i>	3522 C
	7	<i>L. kirschneri</i>	Moskva
	8	<i>L. kirschneri</i>	1051
	10	<i>L. noguchii</i>	CZ 214 K
	12	<i>L. borgpetersenii</i>	L559
	13	<i>L. borgpetersenii</i>	JB197
	15	<i>L. interrogans</i>	Fiocruz L1-130
	16	<i>L. borgpetersenii</i>	Mus 127
	18	<i>L. interrogans</i>	Hardjoprajitno
	19	<i>L. borgpetersenii</i>	Lely 607
	20	<i>L. interrogans</i>	Rachmat
	21	<i>L. interrogans</i>	RGA
	22	<i>L. interrogans</i>	Robinson
	23	<i>L. interrogans</i>	M20
	24	<i>L. interrogans</i>	Jez Bratislava
	25	<i>L. interrogans</i>	Hond Utrecht IV
	26	<i>L. interrogans</i>	Pomona
	27	<i>L. santarosai</i>	TRVL 112499
	28	<i>L. santarosai</i>	1342 K
	29	<i>L. santarosai</i>	CZ 390
	30	<i>L. santarosai</i>	TRVL 109873
	31	<i>L. santarosai</i>	Bovino 131
	32	<i>L. kirschneri</i>	Kambale
	33	<i>L. kirschneri</i>	Wumalasena
	34	<i>L. kirschneri</i>	Bafani
	35	<i>L. kirschneri</i>	5621
	36	<i>L. borgpetersenii</i>	Poi
	37	<i>L. borgpetersenii</i>	Perepelicin
38	<i>L. alexanderi</i>	A23	
39	<i>L. alexanderi</i>	A85	
40	<i>L. noguchii</i>	9160	
41	<i>L. noguchii</i>	M 7	
42	<i>L. noguchii</i>	1161 U	
43	<i>L. weilii</i>	Sarmin	
44	<i>L. weilii</i>	Celledoni	
48	<i>L. genomospecies 3</i>	WaZ Holland	
50	<i>L. weilii</i>	Cox	
Saprófitas	9	<i>L. kmetyi</i>	Bejo-Iso9T
	14	<i>L. wolbachii</i>	CDC
	17	<i>L. biflexa</i>	Patoc I
	46	<i>L. meyeri</i>	ICF
	47	<i>L. meyeri</i>	Veldrat Semarang 173
49	<i>L. biflexa</i>	CH11	

Tabla 2. Secuencias empleadas en el alineamiento de *Leptospira* spp. Secuencias, del gen 16S ARN ribosomal de *Leptospira*, obtenidas de la base de datos GenBank.

Subgrupo	Especies	No.	Número de Acceso GenBank	Serovar	Cepa
Patógenas	<i>L. interrogans</i>	1	AM050579.1	Australis	Ballico
		2	AM050582.1	Bataviae	Swart
		3	AM050571.1	Icterohaemorrhagiae	RGA
		4	AM050586.1	Bratislava	K5A
		5	AM050566.1	Canicola	Utrecht V
		6	AM050565.1	Copenhagani	Wijnberg
		7	AM050568.1	Hardjo	Hardjoprajitno
		8	AM050570.1	Hebdomadis	Hebdomadis
		9	AM050575.1	Pomona	Pomona
		10	AM050578.1	Zanoni	Zanoni
	<i>L. borgpetersenii</i>	11	JN377492.1	MC3	
		12	FJ154592.1	Mini	Sari
		13	HM776722.1	Ballum	CRAN13
		14	AY631884.1	Ballum	Mus 127
		15	NR043259.1	Javanica	Veldrat Batavia 46 ATCC 43292
		16	FJ154593.1	Sejroe	M 84
		17	AM050576.1	Sejroe	M 84
		18	FJ154595.1	Tarassovi	Perepelicin
		19	FJ154596.1	Ceylonica	Piyasena
		20	FJ154579.1	Castellonis	Castellon 3
	<i>L. kirschneri</i>	21	FJ154597.1	Poi	
		22	FJ154562.1	Kambale	
		23	AY996801.1	Bim	PUO 1247
		24	AY996802.1	Bim	1251
		25	NR043051.1	Cynopteri	3522 C ATCC 49945
		26	AM050574.1	Mozdoc	Pomona 5621
		27	AM050567.1	Grippytyphosa	Moskva V
		28	FJ154560.2	Erinaceauriti	Erinaceus Auritus 670
		29	FJ154573.1	Ramisi	Musa
		30	AY461878.1	Kambale	
	<i>L. santarosai</i>	31	AY461876.1	LT1014	
		32	FJ154598.1	Tinidad	TRVL 34056
		33	AY996805.1	Georgia	LT 117
		34	FJ154585.1	Alexi	HS 616
		35	DQ991496.1	Kobbe	
		36	NR043048.1	Shermani	LT 821 ATCC 43286
		37	DQ991496.1	Weaveri	
		38	AY631883.1	Shermani	LT 821
		39	FJ154589.1	Bakeri	LT 79
		40	FJ154584.1	Canalzonae	CZ 288
	<i>L. weilii</i>	41	FJ154583.1	Tropica	CZ 299
		42	FJ154590.1	Vughia	LT 89-68
		43	NR043044.1	Celledoni	Celledoni ATCC 43285
		44	DQ991487.1	Hekou	
		45	DQ991488.1	Lagati	
		46	DQ991489.1	Sarmin	
		47	DQ991490.1	Vughia	
		48	DQ483058.1	Topaz	94-79970/3
		49	AY034037.1		Ecochallenge
		50	AY461891.1		Cox
	<i>L. genospecies 2</i>	51	FJ154581.1	Coxi	
		52			A23
	<i>L. alexanderi</i>	53			
		54			A10
	<i>L. noguchii</i>	55	FJ154582.1	Panama	CZ 214 K
		56	NR043050.1	Panama	CZ 214 K ATCC 43288
		57	DQ991497.1	Cristobali	
		58	EU349495.1		Cascata

Intermedias	<i>L. fainei</i>	59	FJ154574.1	Nicaragua	1011
		60	FJ154588.1	Orleans	LSU 2580
		61	AY461881.1		LSU 2580
		62	AY461882.1		LT796
		63	FJ154587.1	Louisiana	LSU 1945
		64	FJ154575.1	Proechymis	1161 U
		65	U60594.1		
		66	AY996789.1	Hurstbridge	BKID 6
		67	AY631885.1	Hurstbridge	BUT 6
		68	NR043049.1	Hurstbridge	BUT 6
<i>L. inadai</i>	69	FJ154578.1	Hurstbridge	BUT 6	
	70	AY995712.1			
	71	AY631887.1	Kaup	LT 64-68	
	72	JN377490.1		MC1	
	73	JN377491.1		MC2	
	74	AY631896.1	Lyme	10	
	75	AY631891.1	Aguaruna	MW 4	
	76	Z21634.1			
	77	AY796065.1		5399	
	78	NR043200.1		5399 ATCC BAA-1107	
<i>L. broomii</i>	79	AY792329.1		L065	
	80	Y19243.1			
	<i>L. wolffii</i>	81	EF025496.1	Khorat	Khorat-H2
		82			ICF
		83			Sofia 874 rrs
		84			Sofia 874
		85			Bandicoot
		86			Bandicoot
		87			Sofia 874
		<i>L. meyeri</i>	88	AF167353.1	
89					Veldrat Semarang 173
90					Veldrat Semarang 173
91				Veldrat Semarang 173	
92				ICF	
93				Bandicoot	
94				Veldrat Semarang 173	
<i>L. kmetyi</i>	95		NR041544.1	Malaysia	Bejo-Iso9
	96		Z98589.1		mutant
	<i>L. biflexa</i>		97	FJ144577.1	Andamana
		98	AF157070.1		PatocIT
<i>L. wolbachii</i>	99	Z98590.1		mutant	
	100	Z26970.1			
	101	AY631890.2	Gent	Wa Gent	

Tabla 3. Master Mix con Supermix iQ para PCR en Tiempo Real de AB y CD: Concentraciones adecuadas de los reactivos para un volumen de reacción total de 10uL empleando 1uL de ADN extraído de suero humano. El ADN no fue medurado su concentración ni calidad, para evitar cualquier manipulación antes de la amplificación.

Real Time PCR con iQ para A-B/C-D				
2 Número de reacciones				
10 µl Volumen Total				
REACTIVO	Conc. Inicial	Conc. Final	Vol. 1 reac	Volumen Master Mix
iQ™ SYBR® Green Supermix	2 X	1 X	5,00 µl	10,00 µl
Primer F: A/C	10 µM	0,5 µM	0,50 µl	1,00 µl
Primer R: B/D	10 µM	0,5 µM	0,50 µl	1,00 µl
H ₂ O Grado PCR			3,00 µl	6,00 µl
Volumen Total Mater Mix			9,00 µl	18,00 µl
ADN				1,00 µL / rxn

Tabla 4. Master Mix con EvaGreen para PCR en Tiempo Real de AB y CD: Concentraciones adecuadas de los reactivos para un volumen de reacción total de 10uL empleando 1uL de ADN extraído de suero humano. El ADN no fue medurado su concentración ni calidad, para evitar cualquier manipulación antes de la amplificación.

Real Time PCR con EvaGreen para A-B/C-D				
2 Número de reacciones				
10 µl Volumen Total				
REACTIVO	Conc. Inicial	Conc. Final	Vol. 1 reac	Volumen Master Mix
SsoFast™ EvaGreen® Supermix	2 X	1 X	5,00 µl	10,00 µl
Primer F: A/C	10 µM	0,5 µM	0,50 µl	1,00 µl
Primer R: B/D	10 µM	0,5 µM	0,50 µl	1,00 µl
H ₂ O Grado PCR			3,00 µl	6,00 µl
Volumen Total Mater Mix			9,00 µl	18,00 µl
ADN				1,00 µL / rxn

Tabla 5. Master Mix con GoFlexi de reamplificación de AB y CD: Concentraciones de los reactivos para la reamplificación de A-Int y C-Int, a un volumen de reacción total de 20uL, empleando 1,5uL de Amplicón obtenido de PCR en Tiempo Real.

Master Mix PCR para A-Int / C-Int				
5 Número de reacciones				
20 µl Volumen Total				
REACTIVO	Conc. Inicial	Conc. Final	Vol. 1 reac	Volumen en Master Mix
PCR Buffer	5 X	1 X	4,00 µl	20,00 µl
MgCl ₂	25 mM	2 mM	1,60 µl	8,00 µl
dNTPs	1 mM	0,2 mM	4,00 µl	20,00 µl
Go Flexi® Taq Promega™	5 U/µl	0,02 U/µl	0,08 µl	0,40 µl
Primer F: A/C	10 µM	1 µM	2,00 µl	10,00 µl
Primer R: B/C	10 µM	1 µM	2,00 µl	10,00 µl
H ₂ O Grado PCR			4,82 µl	24,10 µl
Volumen Total Mater Mix			18,50 µl	92,50 µl
Amplicón AB/CD				1,50 µL / rxn

Tabla 6. Resultados detallados de los sueros del INSPI-Guayaquil. El procedimiento realizado con los 154 sueros fue: amplificación con PCR en Tiempo Real (100%), selección de presuntos positivos (29.2%), reamplificación (27.9%) e identificación (20.8%). La tabla presenta la cantidad y porcentaje de los sueros procesados en cada una de las etapas realizadas tanto para el fragmento AB como para el CD. De la misma manera presenta las cifras de las especies de *Leptospira* halladas en los sueros.

Muestras	Fragmentos				Sueros	%
	AB	%	CD	%		
Procesados	154	100,0%	154	100,0%	154	
Negativos	129	83,8%	127	82,5%	109	70,8%
Amplificados	25	16,2%	27	17,5%	45	29,2%
AB y CD	---	---	---	---	7	4,5%
Reamplificados	26	16,9%	24	15,6%	43	27,9%
Identificados	17	11,0%	21	13,6%	32	20,8%
AB y CD	---	---	---	---	6	3,9%
<i>L. wolffii</i>	16	10,4%	17	11,0%	28	18,2%
<i>L. borgpetersenii</i>	0	0,0%	2	1,3%	2	1,3%
<i>L. interrogans</i>	0	0,0%	1	0,6%	1	0,6%
<i>L. wolffii/borgpetersenii</i>	1	0,6%	1	0,6%	1	0,6%

Tabla 7. Resultados detallados de los sueros de Portoviejo con AB y CD. El procedimiento realizado con los 100 sueros fue: amplificación con PCR en Tiempo Real (100%), selección de presuntos positivos (75%), reamplificación (34%) e identificación (12%). La tabla presenta la cantidad y porcentaje de los sueros procesados en cada una de las etapas realizadas tanto para el fragmento AB como para el CD. De la misma manera presenta las cifras de las especies de *Leptospira* halladas en los sueros.

Muestras	Fragmentos				Sueros	%
	AB	%	CD	%		
Procesados	100	100,0%	100	100,0%	100	
Negativas	69	69,0%	41	41,0%	25	25,0%
Amplificados (PCR tiempo real)	31	31,0%	59	59,0%	75	75,0%
AB y CD	---	---	---	---	15	15,0%
Reamplificados (PCR convencional)	34	34,0%	0	0,0%	34	34,0%
Identificados (Secuenciación)	12	12,0%	0	0,0%	12	12,0%
AB y CD	---	---	---	---	0	0,0%
Especies	<i>L. wolffii</i>	11	11,0%		11	11,0%
	<i>L. licerasiae</i>	1	1,0%		1	1,0%

Tabla 8. Especificidad del primer Reverse Int. Se evaluó la especificidad del primer Reverse Inter para las PCR A-Int y C-Int. Los fragmentos fueron probados con 17 especies de *Leptospira* de los 3 subgrupos: Patógenas, Intermedias y Saprofíticas. Se usó ADN de referencia proveniente de especies de *Leptospira* clasificadas molecularmente del National Collaboratin Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Amsterdam – Holanda.

<i>Leptospira spp.</i>	Cepa	Evaluación Primer Int		
		A-Int (160 pb)	C-Int (143 pb)	
Intermedias	<i>L. broomii</i>	5399	+	no realizada
	<i>L. fainei</i>	BUT 6	+	no realizada
	<i>L. inadai</i>	10	+	+
	<i>L. wolffii</i>	Korat-H2T	+	+
	<i>L. licerasiae</i>	VAR010	+	+
Patógenas	<i>L. interrogans</i>	Pomona	-	no realizada
	<i>L. kirschneri</i>	Kambale	-	-
	<i>L. borgpetersenii</i>	MUS 127	-	-
	<i>L. noguchii</i>	M7	-	-
	<i>L. alexanderi</i>	A85	-	-
	<i>L. santarosasai</i>	CZ 390	-	-
	<i>L. weilii</i>	Sarmin	-	-
	<i>L. genomospecies 3</i>	Waz Holland	-	-
Saprofíticas	<i>L. biflexa</i>	Patoc I	-	-
	<i>L. meyeri</i>	ICF	-	no realizada
	<i>L. wolbachii</i>	CDC	-	-
	<i>L. kmetyi</i>	Bejo-Iso9T	-	-

Tabla 9. Master Mix con GoFlexi de reamplificación de AB-Int y C-Int: Concentraciones de los reactivos para la reamplificación de A-Int y C-Int, a un volumen de reacción total de 20uL, empleando 1,5uL de Amplicón obtenido de PCR en Tiempo Real.

Master Mix PCR para A-Int / C-Int				
3 Número de reacciones				
20 µl Volumen Total				
REACTIVO	Conc. Inicial	Conc. Final	Vol. 1 reac	Volumen en Master Mix
PCR Buffer	5 X	1 X	4,00 µl	12,00 µl
MgCl ₂	25 mM	2 mM	1,60 µl	4,80 µl
dNTPs	1 mM	0,2 mM	4,00 µl	12,00 µl
Go Flexi @Taq Promega TM	5 U/µl	0,02 U/µl	0,08 µl	0,24 µl
Primer F: A/C	10 µM	0,5 µM	1,00 µl	3,00 µl
Primer R: Int	10 µM	0,5 µM	1,00 µl	3,00 µl
Mol. Grade H ₂ O			7,32 µl	21,96 µl
Volumen Total Mater Mix			19,00 µl	57,00 µl
Amplicón AB/ CD			1,00 µL / rxn	

Tabla 10. Resultados detallados de los sueros de Portoviejo con A-Int y C-Int. El procedimiento realizado con los 100 sueros fue: amplificación con PCR en Tiempo Real (100%), selección de presuntos positivos (75%), reamplificación (31%) e identificación (23%). La tabla presenta la cantidad y porcentaje de los sueros procesados en cada una de las etapas realizadas tanto para el fragmento A-Int como para el C-Int. De la misma manera presenta las cifras de las especies de *Leptospira* halladas en los sueros.

Muestras	Fragmentos				Sueros	%
	A-Int	%	C-Int	%		
Procesados	100	100,0%	100	100,0%	100	
Negativas	69	69,0%	41	41,0%	25	25,0%
Amplificados (con AB y CD, respectivamente)	31	31,0%	59	59,0%	75	75,0%
AB y CD	---	---	---	---	15	15,0%
Reamplificados	17	17,0%	16	16,0%	31	31,0%
Identificados	10	10,0%	16	16,0%	23	23,0%
A-Int y C-Int	---	---	---	---	3	3,0%
Especies	solo <i>L. wolffii</i>	3	3,0%	0	0,0%	
	Co-homología	7	7,0%	14	14,0%	21
	<i>L. inadai</i>	7	7,0%	---	---	
	<i>L. licerasiae</i>	---	---	14	14,0%	
	<i>L. inadai</i>	0	0,0%	1	1,0%	1
	<i>L. interrogans</i>	0	0,0%	1	1,0%	1

Tabla 11. Resultados generales de los sueros de Portoviejo. El procedimiento realizado con los 100 sueros para los fragmentos AB, CD, A-Int y C-Int fue: amplificación con PCR en Tiempo Real (100%), selección de presuntos positivos (75%), reamplificación (47%) e identificación (25%). La tabla presenta la cantidad y porcentaje de los sueros procesados en cada una de las etapas realizadas tanto para el fragmento A-Int como para el C-Int. De la misma manera presenta las cifras de las especies de *Leptospira* halladas en los sueros.

Muestras		Fragmentos				Sueros		%
		AB	%	CD	%			
PCR en Tiempo Real	Procesados	100	100,0%	100	100,0%	100	100,0%	
	Negativas	69	69,0%	41	41,0%	25	25,0%	
	Amplificados	31	31,0%	59	59,0%	75	75,0%	
	AB y CD	---	---	---	---	15	15,0%	

		Amplicones								Sueros		%	
		AB	%	A-Int	%	CD	%	C-Int	%				
Especies	Reamplificados	34	34,0%	16	16%	0	0,0%	20	20,0%	47	47,0%		
	Identificados	12	12,0%	10	10%	0	0,0%	16	16,0%	25	25,0%		
	Co-homología	<i>L. wolffii</i>	11	11,0%	3	3%	0	0,0%	0	0,0%			
		<i>L. wolffii-inadai</i>	0	0,0%	7	7%	0	0,0%	0	0,0%	22	22,0%	
		<i>L. wolffii-licerasiae</i>	0	0,0%	0	0%	0	0,0%	14	14,0%			
		<i>L. inadai</i>	0	0,0%	0	0%	0	0,0%	1	1,0%	1	1,0%	
	<i>L. interrogans</i>	0	0,0%	0	0%	0	0,0%	1	1,0%	1	1,0%		
	<i>L. licerasiae</i>	1	1,0%	0	0%	0	0,0%	0	0,0%	1	1,0%		

14. Figuras

Figura 1. Sección variable del gen 16S ARNr de *Leptospira*. Fragmento del alineamiento general, realizado en MEGA5.1, que muestra la región específica para el grupo de leptospiras intermedias encontrada entre especies patógenas (anaranjado), intermedias (turquesa) y saprofiticas (verde). La región específica se encuentra entre los nucleótidos 132 a 155.

Esquema General del gen 16S en <i>Leptospira sp.</i> entre los Pimers A-B																									
Especies	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	
DATA de Excel L inte	C	C	C	G	A	G	A	G	A	T	C	A	T	A	A	G	A	T	T	T	T	T	C	G	
gi 72416383 emb AM050579.1 <i>Leptospira interrogans</i> serovar Australis 16S rRNA gene strain Ballico	C
gi 204306574 gb FJ154562.1 <i>Leptospira kirschneri</i> serovar Kambale 16S ribosomal RNA gene partial sequence
gi 204306610 gb FJ154598.1 <i>Leptospira santarosai</i> serovar Trinidad strain TRVL 34056 16S ribosomal RNA gene partial sequence	T	G	.	.	.	G	.	A
gi 204306602 gb FJ154590.1 <i>Leptospira weilii</i> serovar Vughia strain LT 89-68 16S ribosomal RNA gene partial sequence	G	T
<i>Leptospira</i> genospecies 2 strain A23 16S ribosomal RNA (rrs) gene partial sequence	G	T
<i>Leptospira alexanderi</i> A10	G	T
gi 204306594 gb FJ154582.1 <i>Leptospira noguchii</i> serovar Panama strain CZ 214 K 16S ribosomal RNA gene partial sequence
gi 67005530 gb AY995712.1 <i>Leptospira fainei</i> 16S ribosomal RNA gene partial sequence	.	.	T	A	C	T	G	C	.	G	.	.	.	C	.	G	A	T	A	.
gi 54112248 gb AY631887.1 <i>Leptospira inadai</i> serovar Kaup strain LT 64-68 16S ribosomal RNA gene partial sequence	.	.	T	A	C	T	G	C	.	G	.	.	.	C	.	G	A	T	A	.
gi 55832798 gb AY796065.1 <i>Leptospira broomii</i> strain 5399 16S ribosomal RNA gene partial sequence	.	.	T	A	C	T	G	C	.	G	.	.	.	C	.	G	A	T	A	.
gi 117415055 gb EF025496.1 <i>Leptospira wolffii</i> serovar Khorat strain Khorat-H2 16S ribosomal RNA gene partial sequence	T	.	T	A	T	T	G	C	.	G	G	A	T	A	.
gi 343200857 ref NR_041544.1 <i>Leptospira kmetyi</i> serovar Malaysia strain Bejo-Iso9 16S ribosomal RNA partial sequence	C	.	.	.	G
gi 6539737 gb AF167353.1 AF167353 <i>Leptospira meyeri</i> 16S ribosomal RNA gene partial sequence	G	A	.	.	G	T	T	C	C	.	G	G	.	.	G	C	.	G	G	G	A	.	T	.	.
<i>Leptospira meyeri</i> Veldrat Semarang 173 gi6539737	G	A	.	.	G	T	T	C	C	.	G	G	.	.	G	C	.	G	G	G	A	.	T	.	.
gi 204306589 gb FJ154577.1 <i>Leptospira biflexa</i> serovar Andamana strain CH 11 16S ribosomal RNA gene partial sequence	G	A	.	.	G	T	T	C	C	.	G	G	.	.	G	C	.	G	G	G	A	.	T	.	.
gi 56549634 gb AY631890.2 <i>Leptospira wolbachii</i> serovar Gent strain Wa Gent 16S ribosomal RNA gene partial sequence	G	A	.	.	G	T	T	C	C	.	G	G	.	.	G	C	.	G	G	G	A	.	T	.	.

Figura 2. Ubicación y secuencia del Primer Int en el gen 16S ARN ribosomal de *Leptospira spp.* El diagrama muestra el gen 16S ARNr de *Leptospira* completo (1600pb), con la ubicación (5´-3´) respectiva de los primer A (verde), B (lila), C (rojo), D (anaranjado) e Int (azul). Los fragmentos generados en PCR, tanto convencional como en tiempo real, son los siguientes: AB (333 pb), CD (292 pb), AInt (160 pb) y CInt (143 pb).

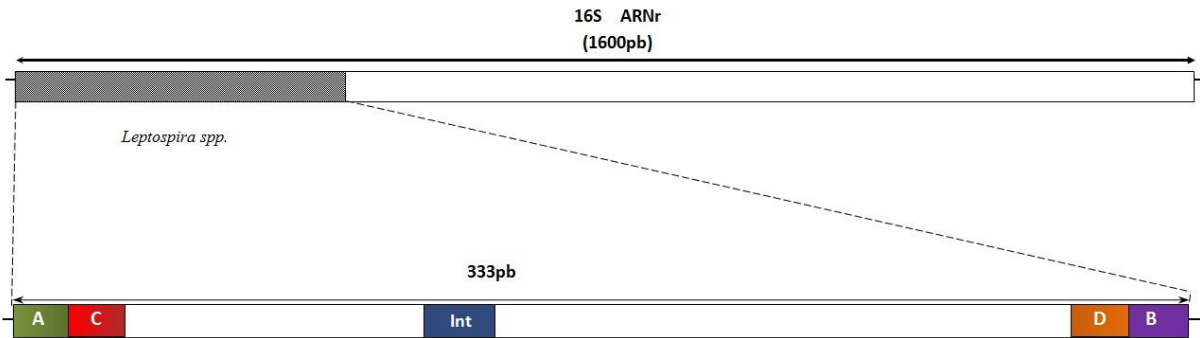


Figura 3. Curvas de amplificación y Picos de Melting del gradiente para el fragmento AB. El gradiente en la Ta de los primer A y B se lo realizó con las siguientes temperaturas: 58° C, 58.5° C, 59.4° C, 60.8° C, 62.5° C, 63.9° C, 64.6° C y 65° C. RFU (Unidad de Fluorescencia Relativa), $-d(\text{RFU})/dT$ (Tasa de disminución de la fluorescencia relativa respecto al aumento de la temperatura).

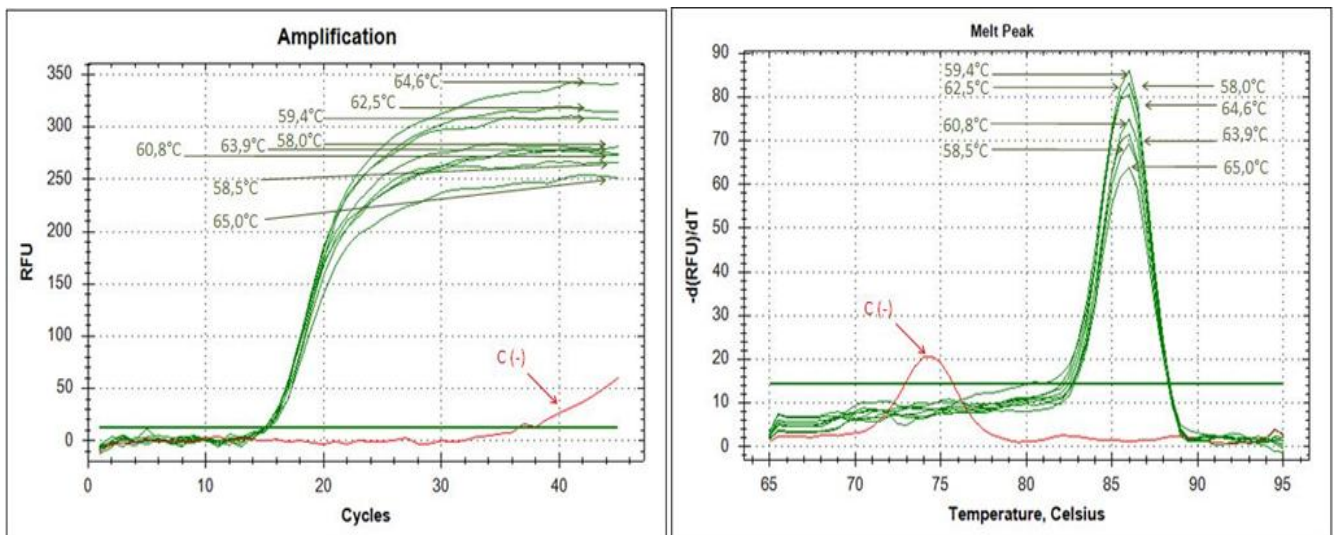


Figura 4. Curvas de amplificación y Picos de Melting del gradiente para el fragmento CD. El gradiente en la Ta de los primer A y B se lo realizó con las siguientes temperaturas: 58° C, 58.5° C, 59.4° C, 60.8° C, 62.5° C, 63.9° C, 64.6° C y 65° C. RFU (Unidad de Fluorescencia Relativa), $-d(\text{RFU})/dT$ (Tasa de disminución de la fluorescencia relativa respecto al aumento de la temperatura).

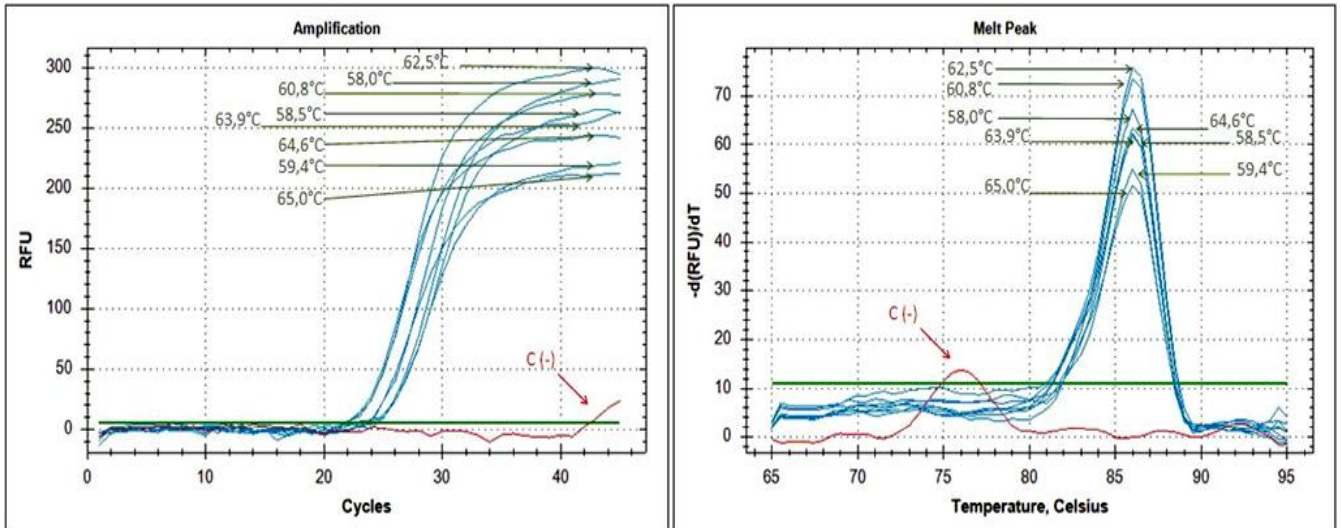


Figura 5. Sensibilidad de PCR en Tiempo Real para el fragmento AB. Se amplificó el fragmento AB en 10 diluciones seriales 1:10, evidenciándose una correlación inversamente proporcional (R^2 0.977), entre la concentración de ADN y el número de ciclos para la amplificación. RFU (Unidad de Fluorescencia Relativa), Cq (Ciclo de cuantificación de la fluorescencia).

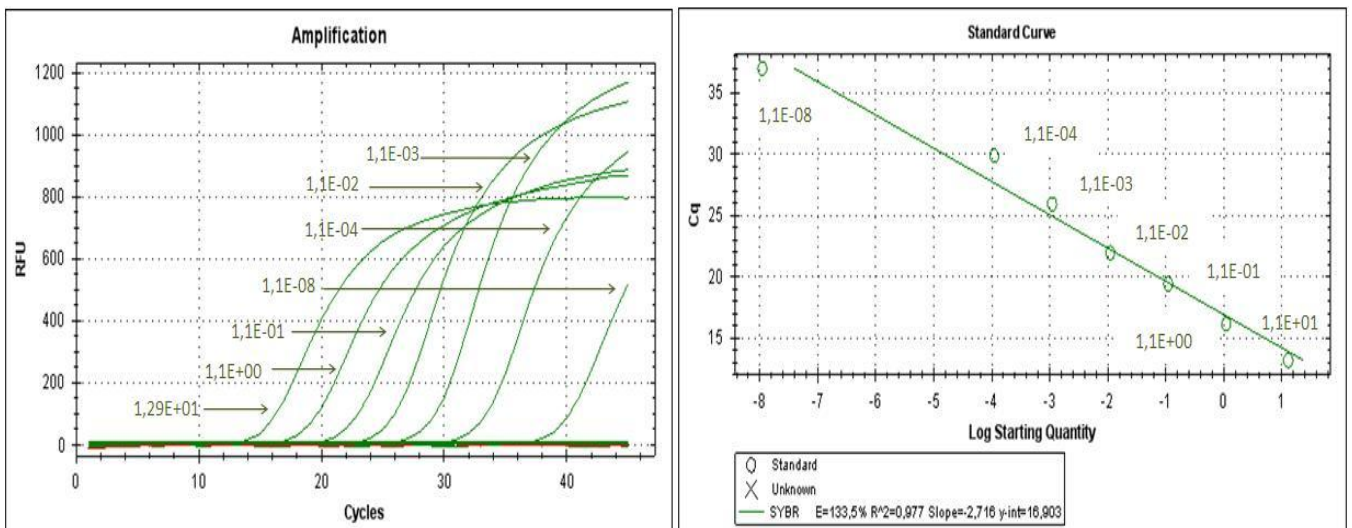


Figura 6. Sensibilidad de PCR convencional para el fragmento AB. Se amplificó el fragmento AB en 10 diluciones seriales 1:10, detectándolo hasta la dilución 1.1E -04. El grosor e intensidad del fragmento (333pb) producido tiene una correlación con la concentración de ADN. Se corrió 5ul de amplicón en gel de Agarosa 1.5% con SYBR Safe, a 70V, durante 50 minutos. Ladder 100pb.

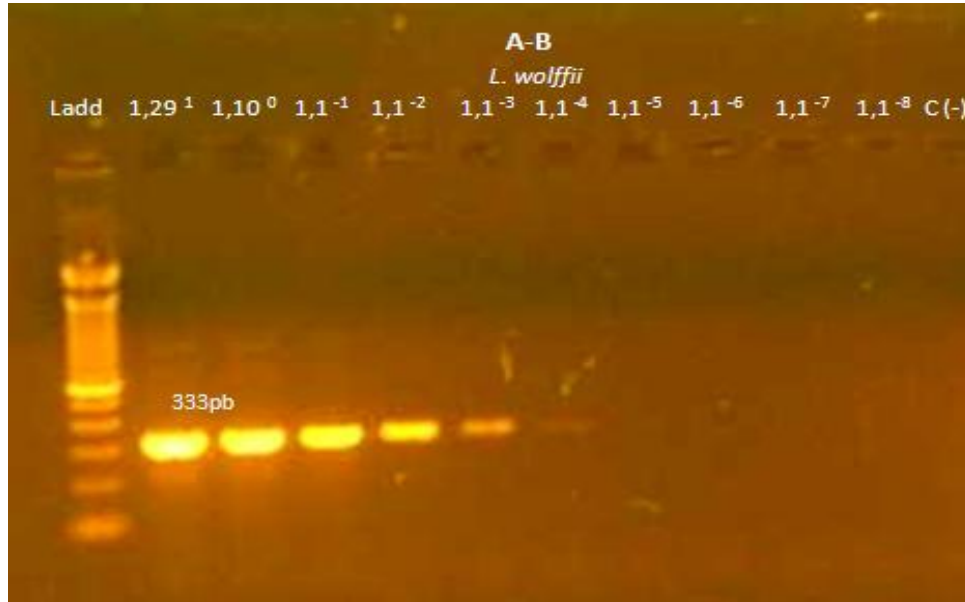


Figura 7. Sensibilidad de PCR en Tiempo Real para el fragmento CD. Se amplificó el fragmento AB en 10 diluciones seriales 1:10, evidenciándose una correlación inversamente proporcional (R^2 0.835), entre la concentración de ADN y el número de ciclos para la amplificación. Se pudo detectar CD hasta la dilución 1.1E -08 en el Cq 32. RFU (Unidad de Fluorescencia Relativa), -d (RFU)/dT (Tasa de disminución de la fluorescencia relativa respecto al aumento de la temperatura).

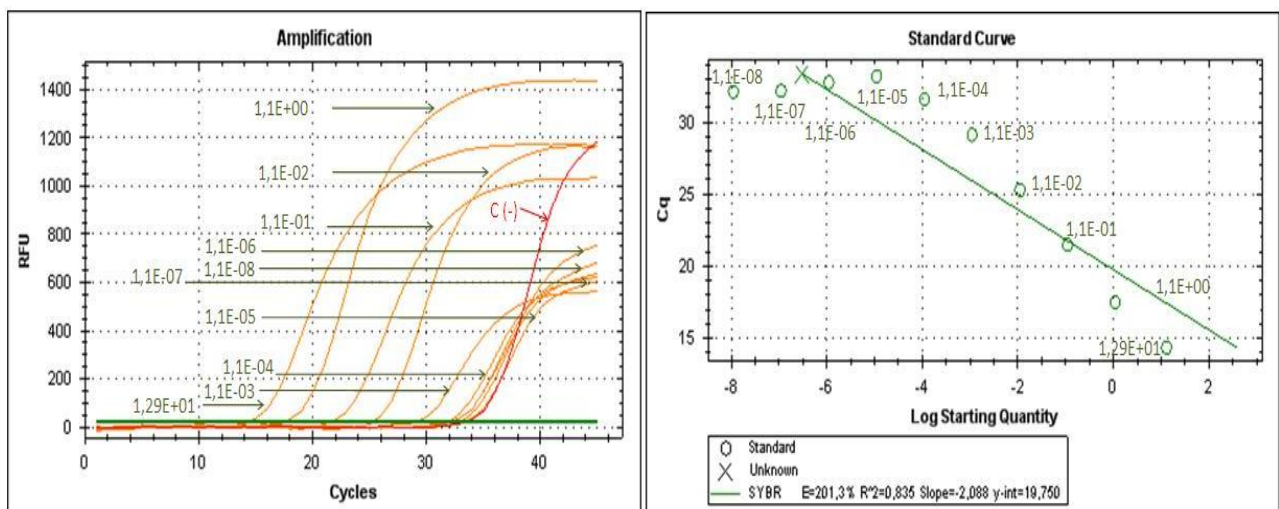


Figura 8. Curva estándar de sensibilidad para CD ajustada. Se eliminó del análisis las diluciones seriales 1.1E-06, 1.1E-7 y 1.1E-8 para hallar una correlación apropiada de entre la concentración de ADN y la RFU percibida. Se obtuvo una línea de tendencia central muy buena (R^2 0.987); ya que se eliminó el ruido de RFU generado por los dímeros de primer.

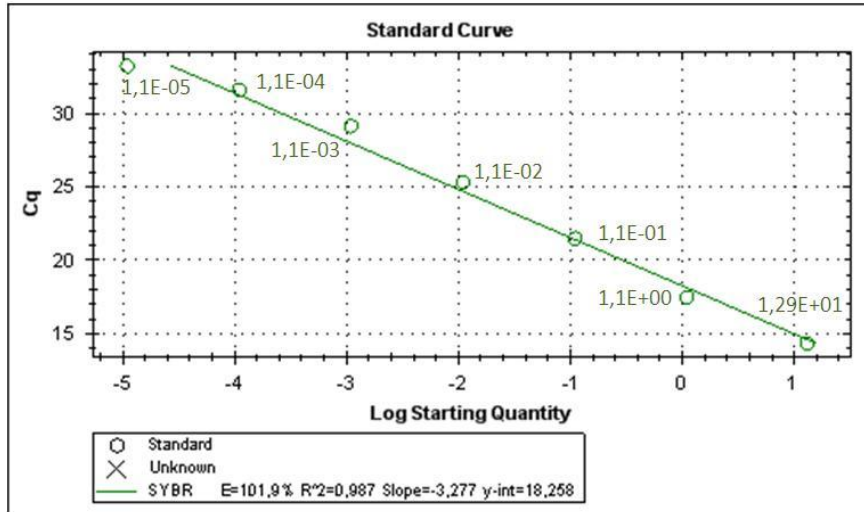


Figura 9. Sensibilidad de PCR convencional para el fragmento CD. Se amplificó el fragmento CD en 10 diluciones seriales 1:10, detectándolo hasta la dilución 1E-03. El grosor e intensidad del fragmento (292pb) producido tiene una correlación con la concentración de ADN. En todas las diluciones se generaron dímeros de primer en alta cantidad (<100pb). Se corrió 5ul de amplicón en gel de Agarosa 1.5% con SYBR Safe, a 70V, durante 50 minutos. Ladder 100pb.

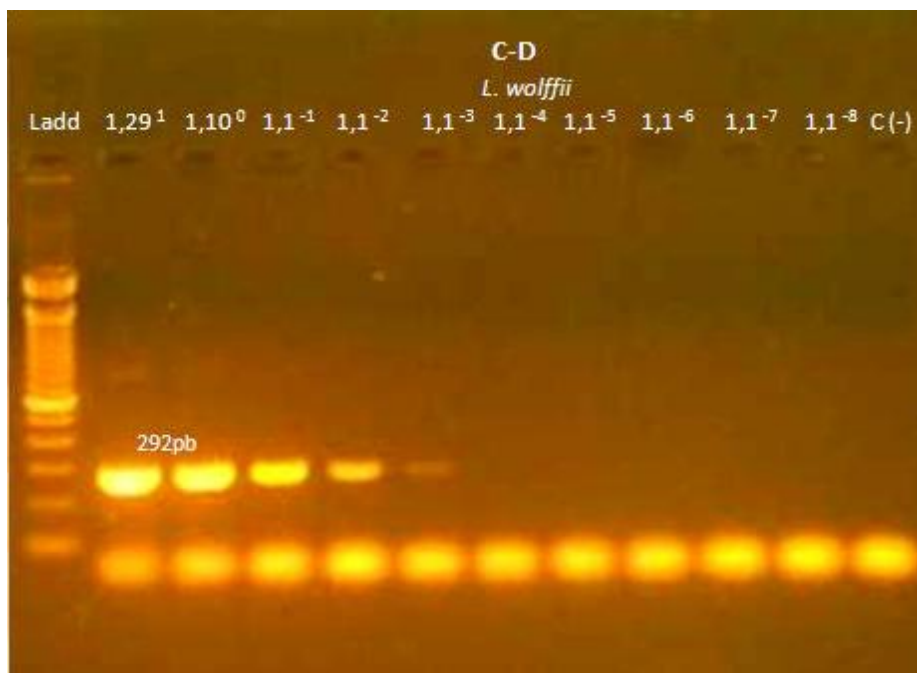


Figura 10. Porcentaje de especies de *Leptospira* en los sueros identificados (INSPI-Guayaquil 2011). De los 32 sueros identificados en total, 28 fueron *L. wolffii*, 2 fueron *L. borgpetersenii*, 1 *L. interrogans* y 1 suero se identificó con *L. wolffii* y *L. borgpetersenii*.

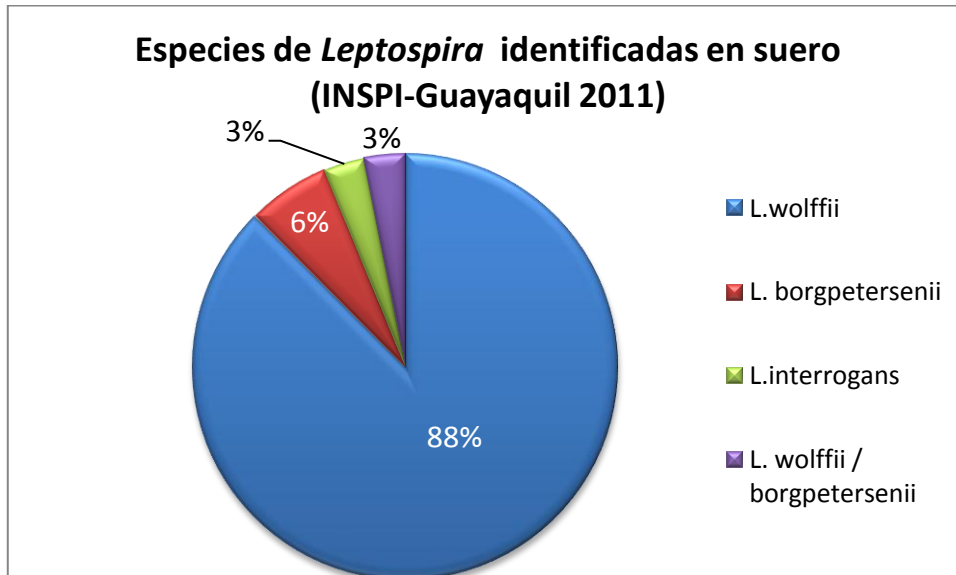


Figura 11. Porcentaje de especies de *Leptospira* en los sueros identificados (Portoviejo 2012). De los 25 sueros identificados en total, 13 fueron *L. wolffii*, 1 fueron *L. licerasiae*, 1 *L. interrogans*, 1 *L. inadai*, 1 *L. wolffii-inadai* y 8 *L. wolffii-licerasiae*.

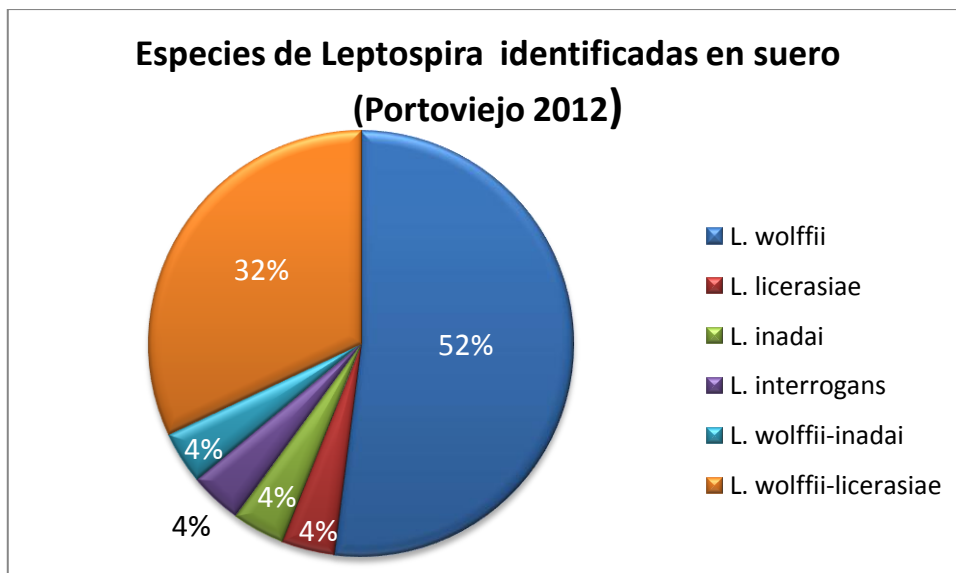


Figura 12. Evaluación del primer Reverse Int (PCR A-Int) con especies Intermedias. Se realizó la PCR A-Int para evaluar la especificidad del primer Reverse Int con 4 especies Intermedias de referencia: *L. bromii*, *L. fainei*, *L. licerasiae* y *L. wolffii*. Se emplearon 3 controles negativos; uno con 1 especie Patógena (*L. interrogans*), otro con 1 especie Saprofítica (*L. meyeri*) y finalmente con H₂O.

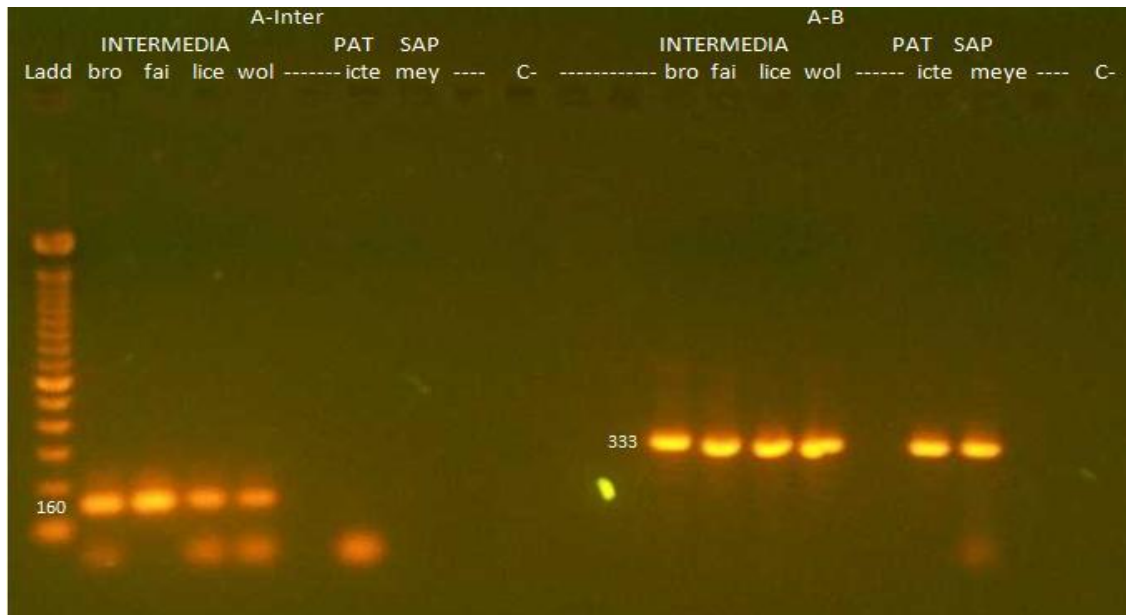


Figura 13. Evaluación del primer Reverse Int (PCR A-Int) con cepas Patógenas (USFQ). Se realizó la PCR A-Int para evaluar la especificidad del primer Reverse Int con 21 cepas de *Leptospira* Patógenas del Instituto de Microbiología de la USFQ.

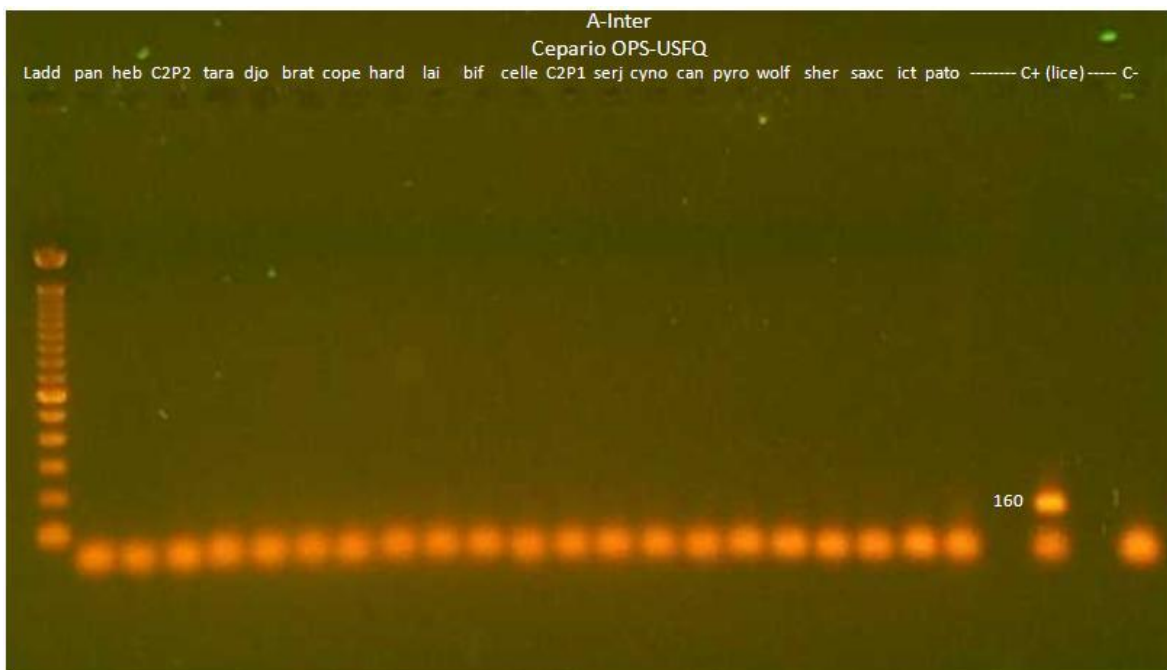


Figura 14. Evaluación del primer Reverse Int (PCR A-Int y C-Int) en *Leptospira spp.* de referencias. Se realizó las PCR A-Int y C-Int para evaluar la especificidad del primer Reverse Int en 11 especies de *Leptospiras* de referencia provenientes del National Collaboratin Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Amsterdam – Holanda..



15. Anexos

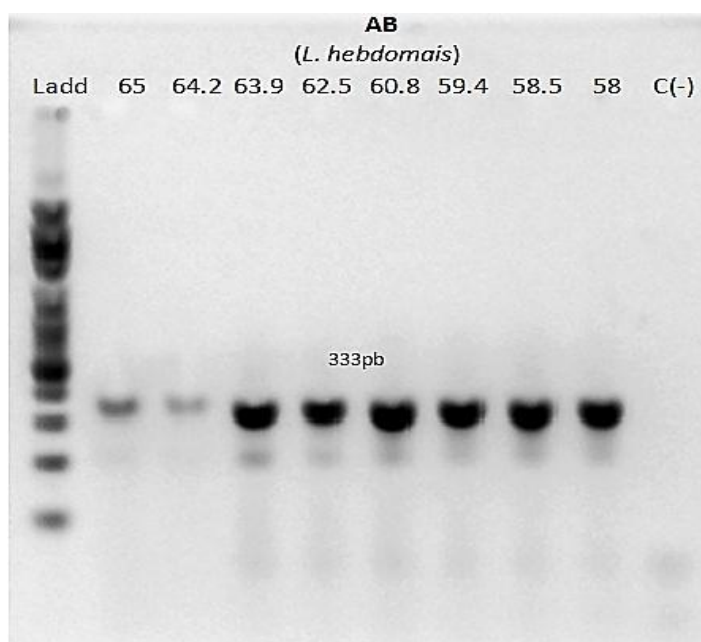
Anexo 1. Listado de Cepas de *Leptospira* patógenas clasificadas serológicamente concedidas por la OPS, las cuales son conservadas y mantenidas en el Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

Cepario de <i>Leptospira</i>	
Universidad San Francisco de Quito	
No.	Serología (Cepa)
1	Hebdomadis
2	Australis
3	Celledonai
4	Bratislava
5	Canicola
6	Javanica
7	Djosiman
8	Bswart
9	Castellanis
10	Wolffii
11	Shermani
12	Tarasovi
13	Pyrogenes
14	Copenhageni
15	Panama
16	Patoc
17	Icteroe
18	Cynopteri
19	Saxcoebing
20	Borincana
21	Hardjo
22	Autummnalis
23	Serjoe

Anexo 2. Gradiente para AB en PCR en Tiempo Real. Resultados de la fluorescencia obtenidos producto de la amplificación con gradiente para AB de la cepa Hebdomadis (Cepario USFQ). Las Temperaturas de anclaje (Ta) evaluadas para los primers A y B fueron: 58° C, 58.5° C, 59.4° C, 60.8° C, 62.5° C, 63.9° C, 64.6° C y 65° C. Cq indica el ciclo en el cual se empezó a percibir la fluorescencia o en el cual empezó la amplificación del fragmento AB. La Temperatura de melting (Tm) para la cepa Hebdomadis fue 86° C.

Ta	Fragmento	Muestra (Serovar)	Cq	Tm
65	AB	<i>L. interrogans</i> hebdomadis	15,29	86
64,6	AB	<i>L. interrogans</i> hebdomadis	14,93	86
63,9	AB	<i>L. interrogans</i> hebdomadis	15,29	86
62,5	AB	<i>L. interrogans</i> hebdomadis	14,9	86
60,8	AB	<i>L. interrogans</i> hebdomadis	15,04	86
59,4	AB	<i>L. interrogans</i> hebdomadis	15,04	86
58,5	AB	<i>L. interrogans</i> hebdomadis	14,94	86
58	AB	<i>L. interrogans</i> hebdomadis	15,25	86
62,5	AB	C (-) H2O	36,54	74,5

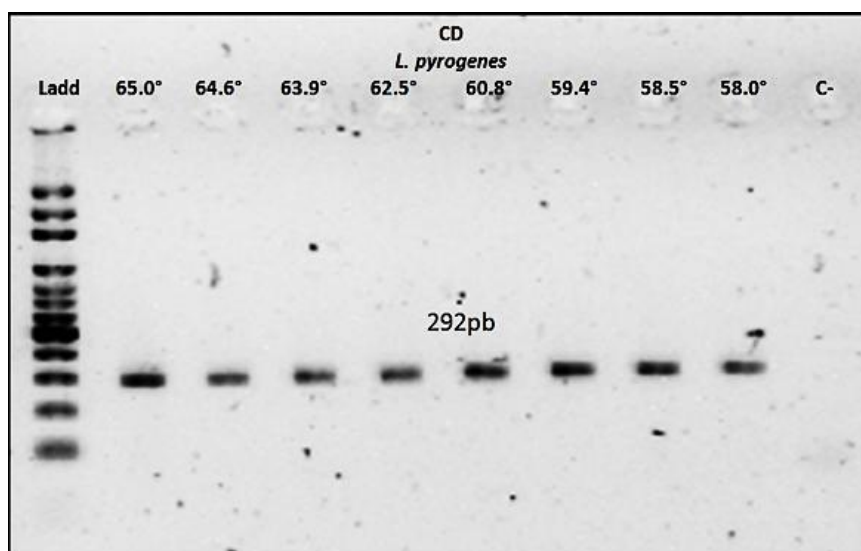
Anexo 3. Electroforesis del gradiente para AB en PCR en Tiempo Real. Los amplicones de AB obtenidos del gradiente en PCR en Tiempo Real, fueron corridos (5uL) en gel de Agarosa 1.5% con SYBR Safe, a 70V durante 50 minutos. Las bandas observadas tienen un tamaño de 333pb, el esperado para AB. Hay gran producción en la mayoría de temperaturas (bandas anchas e intensas), excepto para 64.2° C y 65° C. La temperatura 62.5° C presenta mejor amplificación por su producción y menor inespecificidad (200pb). Ladder 100pb.



Anexo 4. Gradiente para CD en PCR en Tiempo Real. Resultados de la fluorescencia obtenidos producto de la amplificación con gradiente para CD de la cepa Pyrogenes (Cepario USFQ). Las Temperaturas de anclaje (Ta) evaluadas para los primers C y D fueron: 58° C, 58.5° C, 59.4° C, 60.8° C, 62.5° C, 63.9° C, 64.6° C y 65° C. Cq indica el ciclo en el cual se empezó a percibir la fluorescencia o en el cual empezó la amplificación del fragmento CD. La Temperatura de melting (Tm) para la cepa Pyrogenes fue 86° C.

Ta	Fragmento	Muestra (Serovar)	Cq	Tm
65	CD	<i>L. interrogans</i> pyrogenes	22,59	86
64,6	CD	<i>L. interrogans</i> pyrogenes	21,84	86
63,9	CD	<i>L. interrogans</i> pyrogenes	22,03	86
62,5	CD	<i>L. interrogans</i> pyrogenes	21,71	86
60,8	CD	<i>L. interrogans</i> pyrogenes	24,06	86
59,4	CD	<i>L. interrogans</i> pyrogenes	24,48	86
58,5	CD	<i>L. interrogans</i> pyrogenes	24,12	86
58	CD	<i>L. interrogans</i> pyrogenes	23,41	86
62,5	CD	C (-) Mix	42,42	76

Anexo 5. Electroforesis del gradiente para AB en PCR en Tiempo Real. Los amplicones de CD obtenidos del gradiente en PCR en Tiempo Real, fueron corridos (5uL) en gel de Agarosa 1.5% con SYBR Safe, a 70V durante 50 minutos. Las bandas observadas tienen un tamaño de 292pb, el esperado para CD, con una buena producción (grosor e intensidad). Sin embargo, no se aprecia mayor diferencia entre las temperaturas. Ladder 100pb.



Anexo 6. Sensibilidad de AB en PCR en Tiempo Real. Resultados de la fluorescencia obtenidos de la amplificación de las diluciones seriales 1:10 del ADN de especie Intermedia *L. wolffii*. Cq indica el ciclo en el cual se empezó a percibir la fluorescencia o en el cual empezó la amplificación del fragmento AB. La Temperatura de melting (Tm) disminuye conforme la concentración del ADN disminuye. Únicamente las dos primeras diluciones fueron medidas por duplicado.

Dilución	Fragmento	Muestra	Cq	Tm
1,29E+01	AB	<i>L. wolffii</i>	13,85	86
1,10E+00	AB	<i>L. wolffii</i>	17,1	85,5
1,10E-01	AB	<i>L. wolffii</i>	20,4	85,5
1,10E-02	AB	<i>L. wolffii</i>	24,02	85,5
1,10E-03	AB	<i>L. wolffii</i>	26,65	85
1,10E-04	AB	<i>L. wolffii</i>	30,81	85
1,10E-05	AB	<i>L. wolffii</i>	N/A	----
1,10E-06	AB	<i>L. wolffii</i>	N/A	----
1,10E-07	AB	<i>L. wolffii</i>	N/A	----
1,10E-08	AB	<i>L. wolffii</i>	37,57	----
N/A	AB	C (-) Mix	N/A	----

Anexo 7. Sensibilidad de CD en PCR en Tiempo Real. Resultados de la fluorescencia obtenidos de la amplificación de las diluciones seriales 1:10 del ADN de especie Intermedia *L. wolffii*. Cq indica el ciclo en el cual se empezó a percibir la fluorescencia o en el cual empezó la amplificación del fragmento CD. Se obtuvieron para cada una de las diluciones dos Tm, reflejando la formación de Dímeros de primer, característico en la amplificación del fragmento CD. La Tm promedio para los dímeros de primer fue de 76° C. Se usó el mismo ADN en las mismas diluciones empleado para AB.

Dilución	Fragmento	Muestra	Cq	Tm
1,29E+01	CD	<i>L. wolffii</i>	14,11	82,5
				86,5
1,10E+00	CD	<i>L. wolffii</i>	17,27	82,5
				86
1,10E-01	CD	<i>L. wolffii</i>	21,2	82,5
				86
1,10E-02	CD	<i>L. wolffii</i>	25,13	82,5
				86
1,10E-03	CD	<i>L. wolffii</i>	28,66	82,5
				86
1,10E-04	CD	<i>L. wolffii</i>	30,99	82,5
				85,5
1,10E-05	CD	<i>L. wolffii</i>	32,87	75,5
				84
1,10E-06	CD	<i>L. wolffii</i>	32,43	84
				75,5
1,10E-07	CD	<i>L. wolffii</i>	31,85	82,5
				76
1,10E-08	CD	<i>L. wolffii</i>	31,65	75,5
				82,5
2,79E-07	CD	C (-) Mix	33,02	84
				76

Anexo 8. Resultados de PCR en Tiempo Real de los sueros del INSPI-Guayaquil. De los 154 sueros procesados, se presentan únicamente los resultados de fluorescencia obtenidos para los sueros presuntamente positivos con Leptospirosis. Los cuales fueron seleccionados, para los procesos de reamplificación y secuenciación posteriores, por la generación de Picos de melting con $T_m > 80^\circ \text{C}$. Indistintamente de cuál fue el fragmento que generó esta condición, se conservaron los amplicones (-20°C) tanto de AB como de CD, del respectivo suero, para su reamplificación.

No.	Código	Grupo	Real Time PCR			
			AB		CD	
			Cq	Tm	Cq	Tm
1	23878	2°	36,35	90	34,02	77
2	22599	2°	N/A	----	34,65	75,5
3	23653	3°	40,11	90	29,49	80
4	21883	3°	N/A	----	33,72	77
5	22940	4°	N/A	----	34,11	84,5
6	21650	4°	34,75	85,5	38,56	83
7	23162	4°	34,25	85	38,44	86,5
8	22659	4°	N/A	----	36,47	77
9	22015	5°	33,41	85,5	39,63	79
10	22468	5°	32,31	84,5	33,6	83
11	22377	5°	N/A	----	35,08	83
12	22773	5°	30,35	86	34,28	86,5
13	23491	6°	N/A	----	37,36	82,5
14	23348	6°	32,11	85,5	32,59	86
15	23742	6°	32,52	85,5	33,07	83
16	23583	6°	N/A	----	35,66	86,5
17	23571	6°	41	80,5 90	N/A	77
18	23563	6°	34,77	82,5	41,38	76
19	23602	6°	44,83	----	39,16	76,5
20	22232	7°	33,25	77,5 84,5	33,02	83,5
21	25059	7°	36,26	80 87	30,06	77
22	24750	7°	N/A	----	32,72	85
23	24654	7°	33,41	85,5	33,13	76,5
24	25220	7°	N/A	----	30,39	83

						84,5
25	24653	7°	39,06	79 84,5	34,34	77
26	23981	7°	32,43	77,5 86,5	N/A	----
27	24883	7°	37,11	81 90	40,43	76,5
28	24985	7°	N/A	----	34,72	76,5 83
29	25153	8°	N/A	----	30,92	76,5 82
30	24878	8°	33,76	77,5	33,73	76,5 84,5
31	24941	8°	32,4	77,5 84,5	31,27	76,5 81
32	24392	8°	37,43	83,5 87	31,36	76,5
33	24480	8°	35,6	81	30,48	76 82,5
34	24652	9°	34,2	77 84,5	36,25	77
35	24807	9°	N/A	----	40,87	76,5 83
36	24651	9°	35,85	77,5	34,05	81 84,5
37	24217	9°	32,84	75,5 85	34,38	76,5 83
38	24483	9°	34,13	86	33,48	77
39	24791	9°	35,65	85	34,75	77
40	24650	9°	33,89	85,5	32,1	77
41	24812	9°	43,42	77	34,64	83 86,5
42	24223	9°	N/A	----	35,43	77 83
43	24809	9°	36,15	77,5	33,08	81
44	24761	9°	N/A	----	34,37	76,5 84,5
45	24370	9°	34,81	85	34,77	77

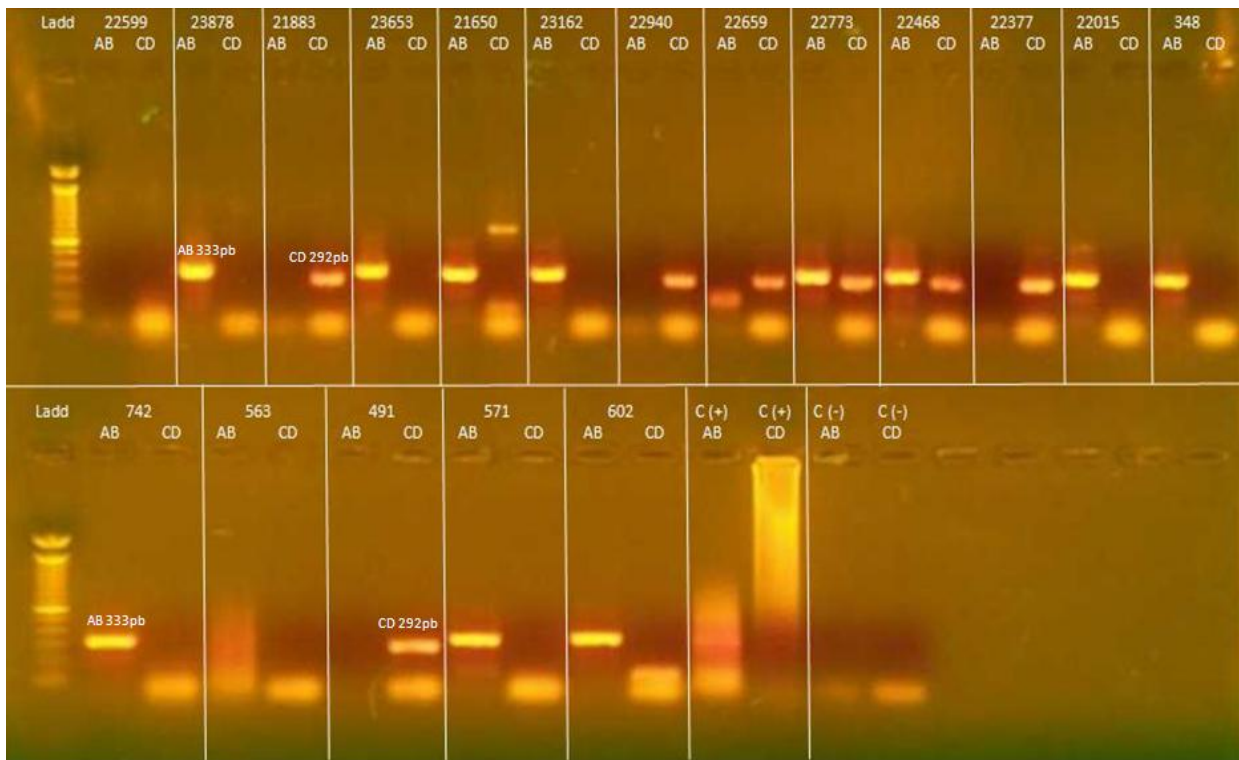
Anexo 9. Resultados de PCR en Tiempo Real de los sueros de Portoviejo. De los 100 sueros procesados, se presentan únicamente los resultados de fluorescencia obtenidos para los sueros presuntamente positivos para la leptospirosis. Los cuales fueron seleccionados, para los procesos de reamplificación y secuenciación posteriores, por la generación de Picos de melting con $T_m > 80^\circ \text{C}$. Indistintamente de cuál fue el fragmento que generó esta condición, se conservaron los amplicones (-20°C) tanto de AB como de CD, del respectivo suero, para su reamplificación.

No.	Código	Grupo	Real Time PCR			
			AB		CD	
			Cq	Tm	Cq	Tm
1	2113	1°	32,81	78 83,5	33,83	75,5 84
2	2120	1°	37,19	77,5	32,54	75,5 83,5
3	2124	1°	33,51	77 83,5	33,04	75,5 84,5
4	2126	1°	33,84	75 84	32,74	75,5 81,5
5	2116	1°	38,73	76,5	33,5	75,5 82
6	2117	1°	36,97	77	33,63	75 82,5
7	2115	1°	34,61	77 83,5	32,54	75,5 83
8	2043	1°	35,99	76,5	32,47	75,5 82,5
9	2044	1°	N/A	----	31,61	75,5 84
10	2045	1°	N/A	----	32,87	75,5 82,5
11	2046	1°	35,54	77	32,44	75,5 84
12	2047	1°	34,44	79	32,46	75,5 82
13	2048	1°	35,16	80,5	32,58	75,5
14	2108	1°	36,23	77	32,13	75,5 83
15	2118	1°	N/A	----	32,08	75,5 84,5
16	2039	1°	N/A	----	33,56	75,5 82,5
17	2040	1°	35,14	84	33,28	75
18	2042	1°	N/A	----	33,14	75,5 84,5
19	2035	1°	N/A	----	32,86	75,5 84
20	2036	1°	34,65	74,5	31,56	75,5 81,5
21	2037	1°	36,06	86	32,03	75,5 82,5
22	2038	1°	38,78	89,5	32,51	75

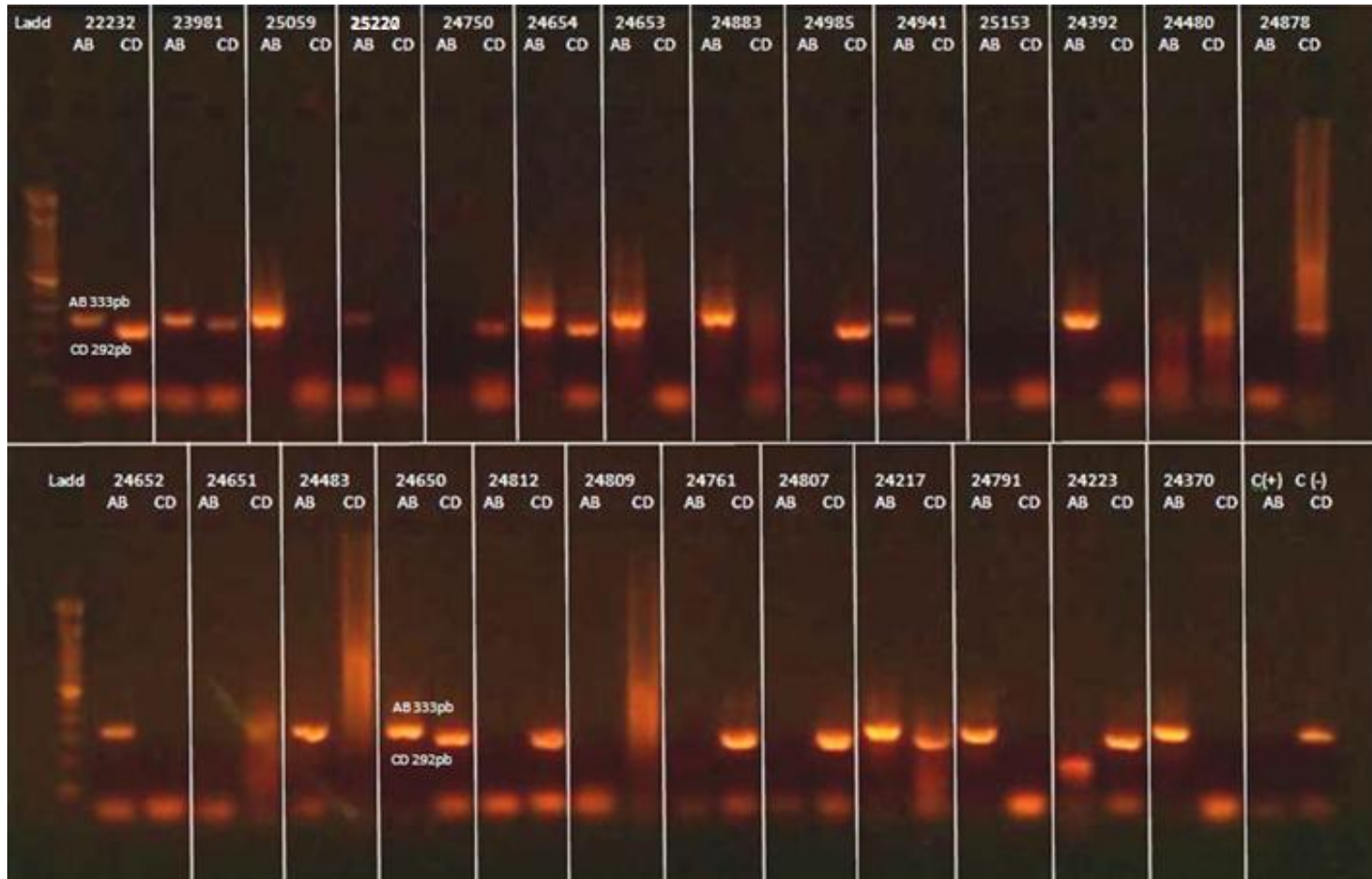
23	2050	1°	N/A	----	31,66	75,5 83
24	2053	1°	32,49	89,5	34,12	75,5
25	5595	2°	37,19	77,5	33,77	75,5 84
26	46	2°	33,12	84 89,5	33,25	75,5 82,5
27	4303	2°	30,53	84,5	31,69	82 85
28	5651	2°	34,08	84	30,43	84
29	4310	2°	N/A	----	32,64	75,5 82
30	4307	2°	36,74	77,5	33,5	75,5 82,5
31	4301	2°	35,48	77,5	33,54	75,5 83,5
32	4317	2°	34,08	76	33,83	82,5
33	4315	2°	N/A	----	32,33	75,5 82,5
34	5659	2°	33,87	75	33,16	75,5 82,5
35	4304	2°	N/A	----	34,24	75,5 84,5
36	51	2°	35,64	81	33,04	75,5 84,5
37	4306	2°	36,71	77,5	33,94	75,5 83
38	19	2°	N/A	----	33,68	75,5 81
39	4312	2°	35,97	81	34,71	75,5
40	5655	2°	N/A	----	33,42	75,5 82
41	4256	2°	N/A	----	34,3	75,5 81,5
42	1517	2°	34,29	77,5 84	32,64	75,5
43	1246	2°	31,14	74,5	32,14	75 82
44	1252	2°	34,68	83,5	32,53	75
45	1484	2°	N/A	----	32,53	75,5 82
46	1323	2°	36,44	76,5 82,5	31,86	75 82
47	1502	2°	N/A	----	31,98	75 83,5
48	1542	2°	N/A	----	32,87	75 82,5
49	1322	2°	N/A	----	32,22	74,5 82
50	1462	2°	36,04	76 83,5	33,06	74,5
51	1368	2°	36,41	83,5	32,39	75
52	1366	3°	42,05	86,5	31,79	75

							84
53	1373	3°	N/A	----	33,07	75,5	84
54	1386	3°	34,36	83,5	32,57	75	
55	2057	3°	N/A	----	32,28	75	84,5
56	2110	3°	N/A	----	32,98	75,5	82,5
57	2365	3°	28,75	74,5 86	32,59	75	
58	1965	3°	N/A	----	32,09	75,5	83,5
59	2025	3°	33,89	76,5 89,5	32,01	75	
60	2019	3°	N/A	----	32,22	75,5	83
61	242	3°	43,43	----	32,45	75	83
62	1960	3°	N/A	----	32,44	74,5	84
63	2022	3°	36,75	71 83,5	32,72	75	82
64	1964	3°	N/A	----	32,01	75	83,5
65	1986	3°	34,66	89,5	33,59	75	
66	2608	3°	39,04	89	32,32	75	83,5
67	2290	3°	43,23	76,5	31,33	75	83
68	2300	3°	35,06	75 85,5	34,02	74,5	82
69	2382	3°	40,73	88,5	33,92	75,5	
70	2299	3°	26,85	89,5	33,72	75	79,5
71	2320	3°	N/A	----	32,77	75,5	84
72	2603	3°	N/A	----	33,82	75,5	84
73	2582	3°	N/A	----	32,62	76	83,5
74	3543	3°	36,51	92,5	33,05	75,5	84,5
75	2526	3°	40,09	85,5	33,09	75,5	83,5

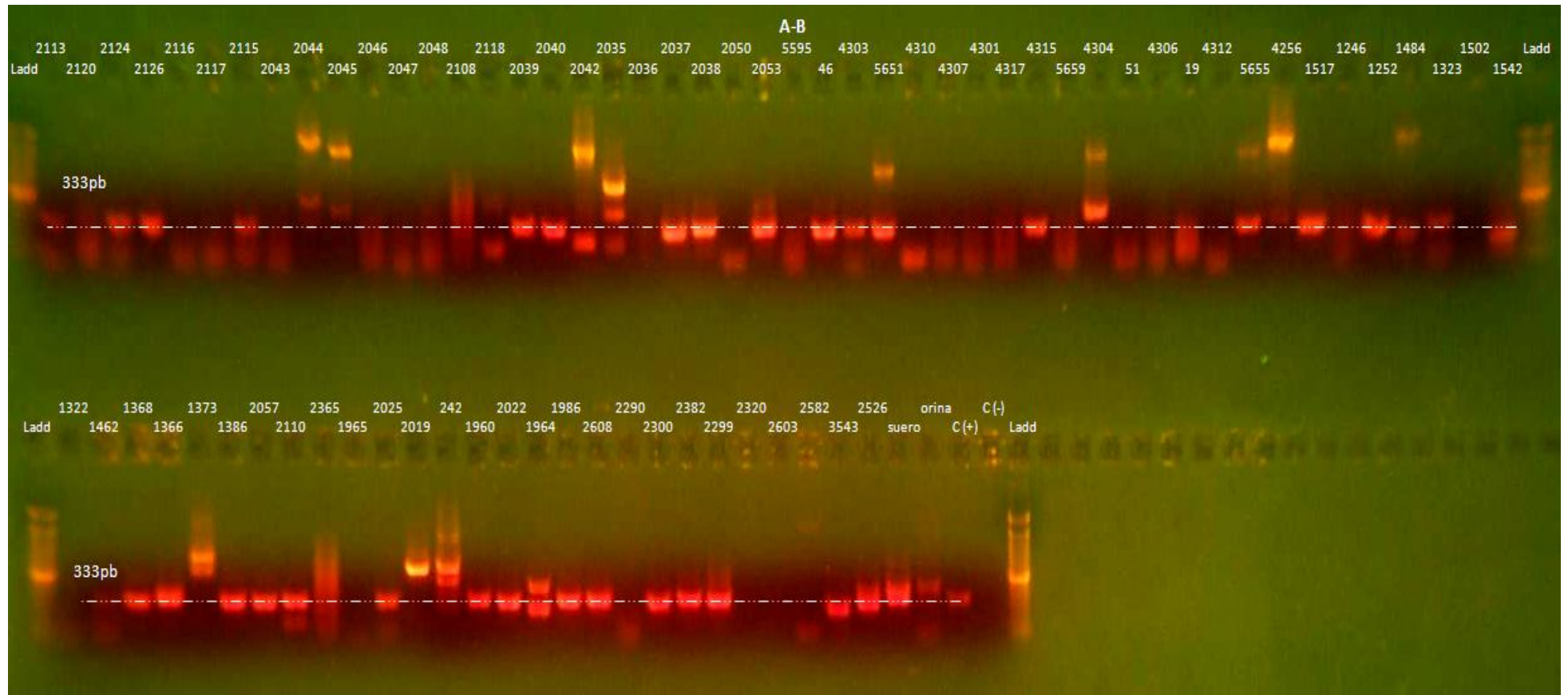
Anexo 10. Reamplificación de AB y CD en sueros del INSPI-Guayaquil (1). De los 45 sueros que amplificaron para AB y CD, en PCR en Tiempo Real, 43 fueron reamplificados en PCR convencional para sus respectivos fragmentos. En la primera grupode reamplificación, 16 sueros reamplificaron con AB (333pb) y CD (292pb): 23878, 21883, 23653, 21650, 23162, 22940, 22659, 22773, 22468, 22377, 22015, 348, 742, 491, 571 y 602. También se generaron bandas inespecíficas en las muestras 21650CD y 22659AB. Todas las reamplificaciones CD generaron dímeros de primer. Ladder 100pb.



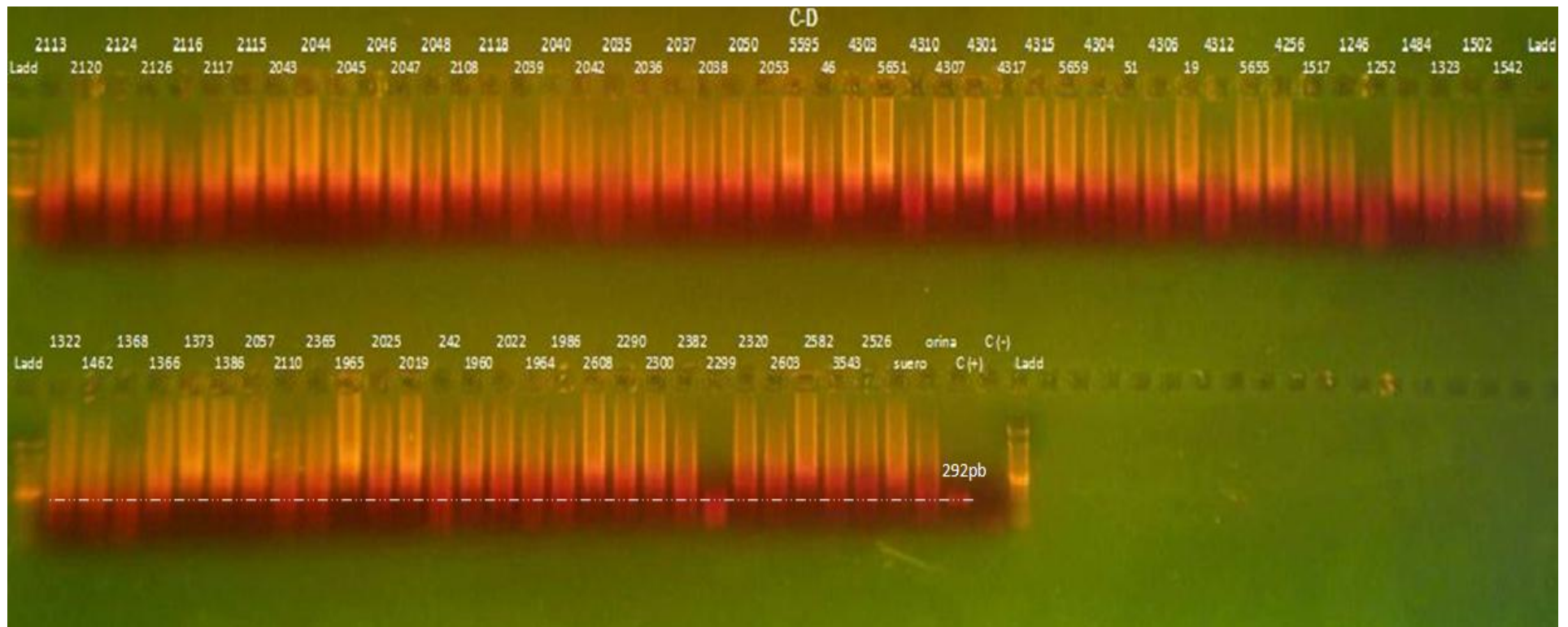
Anexo 11. Reamplificación de AB y CD en sueros del INSPI-Guayaquil (2). De los 45 sueros que amplificaron para AB y CD, en PCR en Tiempo Real, 43 fueron reamplificados en PCR convencional para sus respectivos fragmentos. En la segunda grupode reamplificación, 24 sueros reamplificaron con AB (333pb) y CD (292pb): 22232, 23981, 25059, 25220, 24750, 24654, 24653, 24883, 24985, 24941, 24392, 24480, 24878, 24652, 24651, 24483, 24650, 24812, 24761, 24807, 24217, 24791, 24223 y 24370. También se generó una bandas inespecífica en el suero 24223AB. En algunas reamplificaciones AB y todas las CD generaron dímeros de primer. Ladder 100pb.



Anexo 12. Reamplificación de AB en sueros Portoviejo. De los 75 sueros que amplificaron para AB y CD, en PCR en Tiempo Real, 34 fueron reamplificados en PCR convencional para AB, generando el fragmento respectivo (333pb): 2113, 2124, 2126, 2115, 2039, 2040, 2037, 2038, 2053, 46, 4303, 5651, 4315, 5655, 1517, 1252, 1484, 1323, 1542, 1368, 1366, 1386, 2057, 2110, 2025, 1960, 2022, 1986, 2608, 2300, 2382, 2299, 3543 y 2526. En algunas reamplificaciones se generaron bandas inespecíficas. Ladder 100pb.



Anexo 13. Reamplificación de CD en sueros Portoviejo. De los 75 sueros que amplificaron para AB y CD, en PCR en Tiempo Real, no se obtuvo reamplificación alguna para CD en ningún suero. En lugar de obtener el fragmento CD (292pb), se generaron barridos intensos en casi todos los sueros. Se descartó anomalías en la PCR al constatar la adecuada amplificación de CD del Control Positivo C (+). Ladder 100pb.



Anexo 14. Sueros del INSPI-Guayaquil identificados. Se identificaron 3 especies de *Leptospira* presentes en 32 muestras de suero provenientes del INSPI-Guayaquil. De las cuales 17 se los realizó con el fragmento AB, 21 con el fragmento CD y 6 con ambos.

No. Sueros	Código	Origen	Fecha de recolección	Reamplificación		Identificación	
				AB	CD	AB	CD
1	25220	INSPI	2011	1	0	<i>L. wolffii</i>	----
2	24750	INSPI	2011	0	1	----	<i>L. wolffii</i>
3	24654	INSPI	2011	1	1	<i>L. wolffii</i>	<i>L. wolffii</i>
4	24985	INSPI	2011	0	1	----	<i>L. wolffii</i>
5	24941	INSPI	2011	1	0	<i>L. wolffii</i>	----
6	24480	INSPI	2011	0	1	----	<i>L. wolffii</i>
7	24878	INSPI	2011	0	1	----	<i>L. wolffii</i>
8	24652	INSPI	2011	1	0	<i>L. wolffii</i>	
9	24651	INSPI	2011	0	1	----	<i>L. interrogans</i>
10	24483	INSPI	2011	1	0	<i>L. wolffii</i>	----
11	24650	INSPI	2011	1	1	<i>L. wolffii</i>	<i>L. wolffii</i>
12	24812	INSPI	2011	0	1	----	<i>L. wolffii</i>
13	24809	INSPI	2011	0	1	----	<i>L. wolffii</i>
14	24761	INSPI	2011	0	1	----	<i>L. borgpetersenii</i>
15	24807	INSPI	2011	0	1	----	<i>L. wolffii</i>
16	24217	INSPI	2011	1	1	<i>L. wolffii</i>	<i>L. wolffii</i>
17	24791	INSPI	2011	1	0	<i>L. wolffii</i>	----
18	24223	INSPI	2011	0	1	----	<i>L. wolffii</i>
19	24370	INSPI	2011	1	0	<i>L. wolffii</i>	----
20	21650	INSPI	2011	1	0	<i>L. wolffii</i>	----
21	21883	INSPI	2011	0	1	----	<i>L. borgpetersenii</i>
22	22015	INSPI	2011	1	0	<i>L. wolffii</i>	----
23	22232	INSPI	2011	1	1	<i>L. wolffii</i>	<i>L. borgpetersenii</i>
24	22377	INSPI	2011	0	1	----	<i>L. wolffii</i>
25	22468	INSPI	2011	1	1	<i>L. wolffii</i>	<i>L. wolffii</i>
26	22659	INSPI	2011	0	1	----	<i>L. wolffii</i>
27	22773	INSPI	2011	1	1	<i>L. wolffii</i>	<i>L. wolffii</i>
28	22940	INSPI	2011	0	1	----	<i>L. wolffii</i>
29	23348	INSPI	2011	1	0	<i>L. wolffii</i>	----
30	23491	INSPI	2011	0	1	----	<i>L. wolffii</i>
31	23742	INSPI	2011	1	0	<i>L. wolffii</i>	----
32	23162	INSPI	2011	1	0	<i>L. wolffii</i>	----
Total de Amplicones Identificados				17	21		

Anexo 15. Secuencia identificada de la especie *L. wolffii* encontrada en los sueros del INSPI-Guayaquil con AB y CD.

EF025496.1 *Leptospira wolffii* serovar Khorat strain Khorat-H2 16S ribosomal RNA gene partial sequence

5` (10) GGCGGCGCGTCTTAAACATGCAAGTCGAGCGGAGTAGCAATACTT
AGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTTCCTCCGAATCTGGGATAA
CTTCCGAAAGGAAAGCTAATACCGGATAGTTCTATTGGATCACAGGATTTGA
TAGATAAAGGTTTACTGTTTCGGAGATGAGCCCGCGGCCGATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTC
GGCCACAATGGAAGTGGAGACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAA
GAATCTTGCTCAATGGGGG (338) 3`

Anexo 16. Secuencia identificada de la especie *L. borgpetersenii* encontrada en los sueros del INSPI-Guayaquil con AB y CD.

NR_074526.1 *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo-bovis str. L550 16S ribosomal RNA complete sequence.

5` (58) CAAGTCAAGCGGAGTAGCAATACTCAGCGGCCGAACGGGTGAGTA
ACACGTGGGTAATCTTCCTCCGAGTCTGGGATAACTTTCCGAAAGGGGAGCTA
ATACTGGATAGTCCCGAGAGATCATAGGATTTTTCGGGTAAAGATTTATTGCTC
GGAGATGAGCTCGCGCCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGG
CGACGATCGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTTTCGGCCACAATGGAAGTGGAGAC
ACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAG (342) 3`

Anexo 17. Secuencia identificada de la especie *L. interrogans* encontrada en los sueros del INSPI-Guayaquil con AB y CD.

EU497658.1 *Leptospira interrogans* strain LPI-1 16S ribosomal RNA gene partial sequence.

5` (121)TAAGATTTTTCGGGTAAAGATTTATTGCTCGGAGATGAGCCC GCG
TCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCGGTAGCC
GGCCTGAGAGGGTGTTCGGCCACAATGGA ACTGAGACACGGTCCATACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGGTAAAG (291) 3`

Anexo 18. Sueros de Portoviejo identificados con AB y CD. Se identificaron 2 especies de *Leptospira* presentes en 12 muestras de suero provenientes de Portoviejo. Todos los sueros se identificaron con el fragmento AB, ya que no hubo reamplificaciones con CD; a pesar de los 75 sueros presuntamente positivos. De igual manera *L. wolffii* fue la especie predominante.

No.	Código	Origen	Fecha de Recolección	Reamplificación		Identificación	
				AB	CD	AB	CD
1	2113	IESS	05/06/12	1	0	<i>L. wolffii</i>	----
2	2124	IESS	05/06/12	1	0	<i>L. wolffii</i>	----
3	2126	IESS	05/06/12	1	0	<i>L. wolffii</i>	----
4	2115	IESS	05/06/12	1	0	<i>L. licerasiae</i>	----
5	4303	INSPI	18/12/2012	1	0	<i>L. wolffii</i>	----
6	5651	INSPI	12/12/2012	1	0	<i>L. wolffii</i>	----
7	4315	INSPI	20/02/2012	1	0	<i>L. wolffii</i>	----
8	1517	INSPI	14/05/2012	1	0	<i>L. wolffii</i>	----
9	1252	INSPI	30/04/2012	1	0	<i>L. wolffii</i>	----
10	1368	INSPI	07/05/2012	1	0	<i>L. wolffii</i>	----
11	1386	INSPI	07/05/2012	1	0	<i>L. wolffii</i>	----
12	2022	INSPI	25/10/2011	1	0	<i>L. wolffii</i>	----
Total Amplicones Identificados				12	0		

Anexo 19. Secuencia identificada de la especie *L. wolffii* encontrada en sueros de Portoviejo con AB.

NR_044042 *Leptospira wolffii* serovar Khorat strain Khorat-H2 16S ribosomal RNA partial sequence.

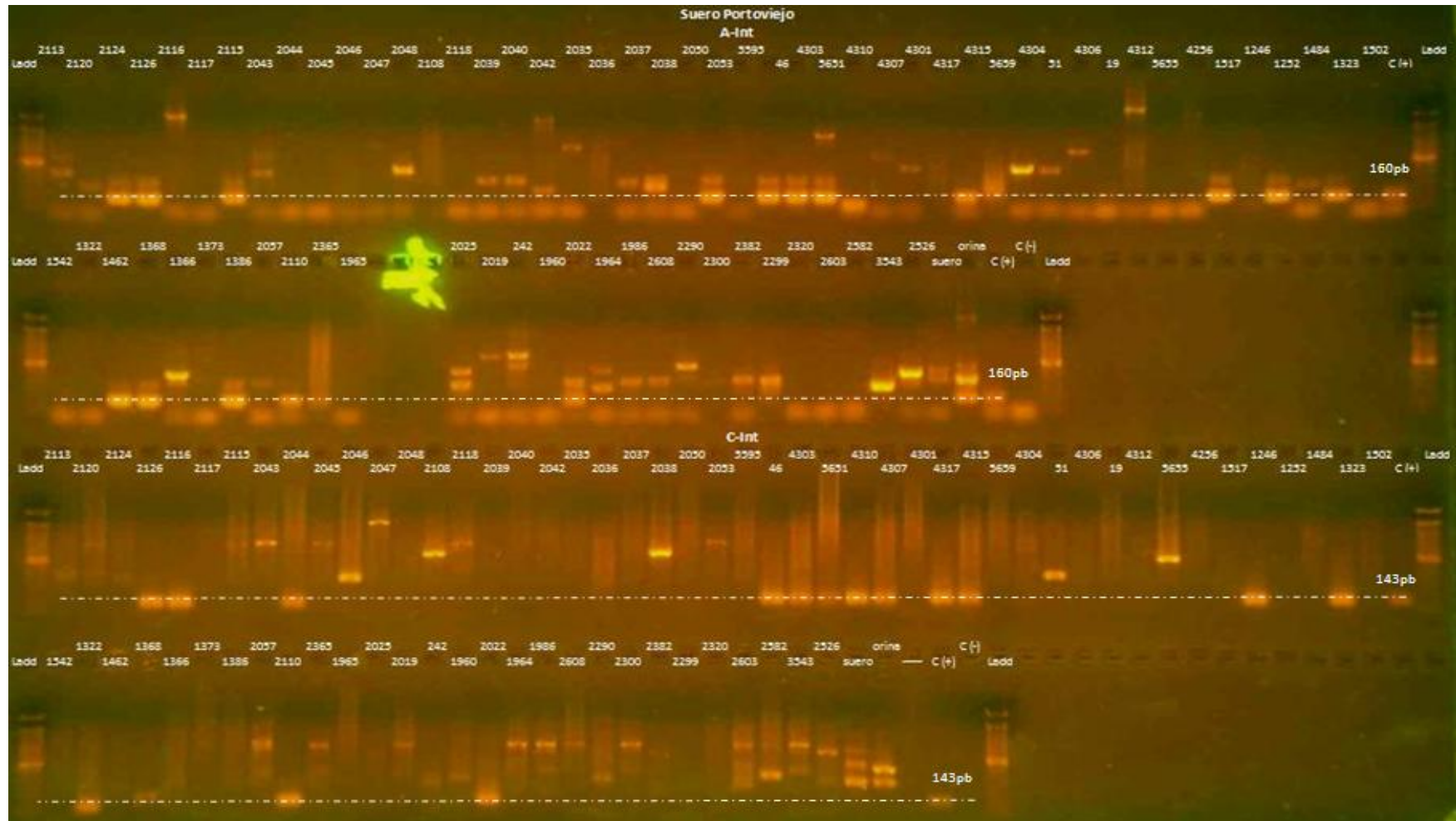
5[^](11)CTTAAACATGCAAGTCGAGCGGAGTAGCAATACTTAGCGGCGAAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTTCCTCCGAATCTGGGATAACTTTCCGAAA
GGAAAGCTAATACCGGATAGTTCTATTGGATCACAGGATTTGATAGATAAAGG
TTTACTGTTTCGGAGATGAGCCCGCGGCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGG
CTCACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCCGGCCACAATGG
AACTGAGACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAAGAATCTTGCTC
AATGGGGG (328) 3[^]

Anexo 20. Secuencia identificada de la especie *L. licerasiae* encontrada en sueros de Portoviejo con AB.

EF612288 *Leptospira licerasiae* serovar Varillal strain HAI029 16S ribosomal RNA gene partial sequence.

5[^](up_strim17)GGCGCGTCTTAAACATGCAAGTCGAGCGGAGTAGCAATA
CTTAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTTCCTCCGAATCTGGGA
TAACTTTCCGAAAGGAAAGCTAATACCGGATAGTTCTATTGGATCACAGGATT
TGATAGATAAAGGTTTACTGTTTCGGAGATGAGCCCGCGGCCGATTAGCTAGTT
GGTGAGGTAATGGGTCACCAAGGCGACGATCGGTAG (217) 3[^]

Anexo 21. Reamplificación de A-Int y C-Int en sueros de Portoviejo. De los 75 sueros que amplificaron para AB y CD, en PCR en Tiempo Real, 17 reamplificaron para A-Int (160pb) y 16 para C-Int (143pb). Los sueros reamplificados para A-Int fueron: 2124, 2126, 2115, 2053, 46, 4303, 5651, 4315, 5659, 1517, 1252, 1323, 1462, 1368, 1386, 2110 y 2022. Los sueros reamplificados para C-Int fueron: 2126, 2116, 2044, 46, 4303, 5651, 4310, 4307, 4317, 4315, 1246, 1323, 1322, 1368, 2110 y 2022. Varios amplificados generaron bandas inespecíficas. El Control positivo (C+) fue *L. licerasiae*. Ladder 100pb.



Anexo 22. Sueros de Portoviejo identificados con A-Int y C-Int. Se identificaron 3 especies de *Leptospira* presentes en 23 muestras de suero provenientes de Portoviejo. De las cuales 10 se los realizó con el fragmento A-Int, 16 con el fragmento C-Int y 3 con ambos. Siendo el fragmento C-Int más sensible para identificar el gen 16S ARN ribosomal. La presencia de *L. wolffii* fue predominante, encontrándola en 21 sueros. Hubo homología con otras especies Intermedias (*L. inadai* y *L. licerasiae*) en la identificación; debido al pequeño tamaño de los fragmentos A-Int (160pb) y C-Int (143pb).

No. Sueros	Código	Origen	Fecha de recolección	Reamplificación		Identificación	
				A-Int	C-Int	A-Int	C-Int
1	2124	IESS	05/06/12	1		<i>L. wolffii-inadai</i>	-----
2	2126	IESS	05/06/12	1	1	<i>L. wolffii-inadai</i>	<i>L. wolffii-licerasiae</i>
3	2116	IESS	05/06/12		1	-----	<i>L. wolffii-licerasiae</i>
4	2115	IESS	05/06/12	1		<i>L. wolffii-inadai</i>	-----
5	2044	IESS	04/06/12		1	-----	<i>L. inadai</i>
6	2048	IESS	04/06/12		1	-----	<i>L. interrogans</i>
7	2053	IESS	04/06/12	1		<i>L. wolffii</i>	-----
8	46	INSPI	07/01/2013		1	-----	<i>L. wolffii-licerasiae</i>
9	4303	INSPI	18/12/2012		1	-----	<i>L. wolffii-licerasiae</i>
10	5651	INSPI	12/12/2012		1	-----	<i>L. wolffii-licerasiae</i>
11	4310	INSPI	19/12/2012		1	-----	<i>L. wolffii-licerasiae</i>
12	4307	INSPI	19/12/2012		1	-----	<i>L. wolffii-licerasiae</i>
13	4317	INSPI	20/02/2012		1	-----	<i>L. wolffii-licerasiae</i>
14	4315	INSPI	20/02/2012	1	1	<i>L. wolffii-inadai</i>	<i>L. wolffii-licerasiae</i>
15	1517	INSPI	14/05/2012	1		<i>L. wolffii-inadai</i>	-----
16	1246	INSPI	30/04/2012		1	-----	<i>L. wolffii-licerasiae</i>
17	1252	INSPI	30/04/2012	1		<i>L. wolffii</i>	-----
18	1323	INSPI	03/05/2012	1	1	<i>L. wolffii</i>	<i>L. wolffii-licerasiae</i>
19	1322	INSPI	03/05/2012		1	-----	<i>L. wolffii-licerasiae</i>
20	1462	INSPI	10/05/2012	1		<i>L. wolffii-inadai</i>	-----
21	1368	INSPI	07/05/2012	1		<i>L. wolffii-inadai</i>	-----
22	2110	INSPI	05/06/2012		1	-----	<i>L. wolffii-licerasiae</i>
23	2022	INSPI	25/10/2011		1	-----	<i>L. wolffii-licerasiae</i>
Total Amplicones Identificados				10	16		

Anexo 23. Secuencia identificada de la especie *L. wolffii* encontrada en sueros de Portoviejo con AInt y CInt.

NR_044042 *Leptospira wolffii* serovar Khorat strain Khorat-H2 16S ribosomal RNA partial sequence.

5'(1)GGCGGCGCGTCTTAAACATGCAAGTCGAGCGGAGTAGCAATACTTAG
CGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTTCCTCCGAATCTGGGATAACTTT
CCGAAAGGAAAGCTAATACCGGATAGTTCTATTGGATCACAGGATTTGATAGGTA
AAG (160) 3'

Anexo 24. Secuencia identificada de la especie *L. inadai* encontrada en sueros de Portoviejo con AInt y CInt.

JQ988844 *Leptospira inadai* strain Lyme_DB56 16S ribosomal RNA gene partial sequence.

5'(14)CAAGTCAAGCGGAGTAGCAATACCTAGCGGCGAACGGGTGAGTAAC
ACGTGGGTAATCTTCCTCCGAGTCTGGGATAACCTTCCGAAAGGAAAGCTAATAC
CGAATAGTCCTACTGGATCACAAGATCTGATAGGTAAAGA (155) 3'

Anexo 25. Secuencia identificada de la especie *L. interrogans* encontrada en sueros de Portoviejo con AInt y CInt.

KC441522 *Leptospira interrogans* serovar Grippotyphosa strain STH 16S ribosomal RNA gene partial sequence.

5'(9)CAAGTCAAGCGGAGTAGCAATACTTAGCGGCGAACGGGTGAG_AACA
CGTGGGTAATCCTCCTCGGAGTCTGGGA (84) 3'