

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Estudio Piloto: Detección de *Leptospira* en el cantón Portoviejo (Manabí).

Andrea Romina Sosa Moreno

Verónica Barragán, MSc., Director de Tesis

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

Quito, mayo 2015

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Estudio Piloto: Detección de *Leptospira* en el cantón Portoviejo (Manabí).

Andrea Romina Sosa Moreno

Verónica Barragán, MSc.,

Director de Tesis

María de Lourdes Torres, PhD.,

Miembro del Comité de Tesis

Gabriel Trueba, PhD.,

Miembro del Comité de Tesis

Stella de la Torre, PhD.,

Decano del Colegio de Ciencias

Biológicas y Ambientales

Quito, mayo de 2015

© 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: Andrea Romina Sosa Moreno

C. I.: 080251582-5

Lugar y fecha: Quito, mayo 2015

Dedicatoria

Para mis súper-heroínas, mis guerreras invencibles, mis luchadoras incansables, María del Carmen Moreno y Manuelita Pérez. Uds. me motivaron día a día a llegar a lo imposible. Gracias por cada queja, sollozo, exageración, etc.

A todos aquellos que no se conforman con lo que poseen, sino que tienen el coraje de perseguir sus sueños a pesar de las dificultades y luchan por lo que realmente merecen.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad San Francisco de Quito por haberme dado la oportunidad de ser becaria y permitirme ser parte de este enriquecedor ambiente universitario.

A mis padres por su apoyo constante en cada una de las etapas de mi vida. A Jeison por su incansable capacidad para hacerme salir de mis casillas y aun así, ser mi ejemplo a seguir. A Arianna por ser mi cajita de secretos.

A mis mentores Verónica Barragán y Gabriel Trueba, valiosos científicos y maravillosas personas, por su confianza, amistad, tiempo y apoyo.

A María de Lourdes Torres y Stella de la Torre por cultivar la curiosidad, el conocimiento y la sabiduría en cada uno de nosotros, sus estudiantes.

A mis profesores quienes han compartido sus conocimientos académicos, experiencias, pero sobre todo su espíritu humano.

A mis compañeros de laboratorio quienes con paciencia supieron guiarme: George, Bernie, Marie, Gaby, Cris, y muchos más.

A todos los amigos que hice durante mi vida universitaria. En especial a mis Biotecs por el increíble ambiente de amistad, confianza y camaradería. ¡Somos la mejor generación!

A mi pequeña mafia: Ardilla, Mont, Carlita, Parce, Psycho, Denice, Giviana. Gracias por todas las risas y aventuras.

Resumen

La leptospirosis es una enfermedad que ha sido poco estudiada en Ecuador. Se conoce que es altamente prevalente en algunas provincias costeras de nuestro país, entre las que se encuentra Manabí. Datos oficiales del Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación del Ecuador, indican que la mayoría de casos de leptospirosis en dicha provincia se concentran en el cantón Portoviejo. Por esta razón, esta zona es un lugar ideal para estudiar la transmisión y diseminación de la enfermedad. El objetivo principal del presente estudio fue desarrollar un proyecto piloto que permita monitorear la enfermedad. Para esto, secolectó muestras de orina animal, sueros y orina humana, riñones de rata, y muestras de agua de río. Todas las muestras fueron analizadas utilizando PCR en tiempo real, PCR convencional y secuenciación de los amplicones obtenidos. Adicionalmente, se determinó la especificidad de la PCR en tiempo real utilizada mediante el análisis del ciclo umbral (Cycle threshold). El análisis de las muestras colectadas detectó ADN de *Leptospira* en todos los tipos de muestras, excepto en sueros humanos. El alto porcentaje de muestras de orina de cerdos y vacas positivas (17.8%), sugiere que son importantes portadores y dispersores de leptospirosis en esta área. La presencia de ADN de *Leptospira* en una de cuatro muestras de agua de río y en el 8.8% de muestras de riñones de rata indican que éstos también juegan un rol importante en la transmisión de la leptospirosis. El presente estudio es el primero en analizar todos los componentes del ciclo de transmisión de la leptospirosis (animales portadores y ambiente) en el Ecuador. Los resultados constituyen la línea base para realizar estudios futuros que permitan comprender la transmisión y factores de riesgo de la enfermedad en nuestro país.

Abstract

Leptospirosis is a disease that has not been extensively studied in Ecuador. It is well known that the disease is highly prevalent in some areas of the Ecuadorian Coast, predominantly in Manabí. Official data from the National Institute of Public Health and Research of Ecuador, indicate that most of the cases are concentrated in Canton Portoviejo. For this reason, this area is an ideal place to study the transmission and spread of the disease. The main aim of this study was to develop a pilot study that allow us to monitor the disease. Therefore, we collected urine samples from domestic animals, serum and human urine, rat kidneys, and water samples. All the samples were analyzed by real time PCR, conventional PCR, and amplicon sequencing. Furthermore, we determine the specificity of the Real Time PCR by analyzing the Cycle Threshold (Ct). *Leptospira* DNA was detected in all the samples except for human sera. High percentage of urine positive samples from pigs and cows (17.8%), suggest that they are important carriers and spreaders of leptospirosis in this area. The presence of *Leptospira* DNA in one out of four samples of river water and in 8.8% of rat kidneys samples suggests that they also play an important role in the transmission of leptospirosis within the studied area. This is the first study that analyzes all the components of leptospirosis transmission cycle (carrier animals and environment) in Ecuador. These results constitute a baseline to perform future studies in order to understand the transmission and risk factors of the disease in our country.

Tabla de contenido

1.	Introducción.....	1
1.1.	Características del género <i>Leptospira</i>	1
1.2.	Leptospirosis	2
1.2.1.	Epidemiología y Vías de Contagio.....	2
1.2.2.	Sintomatología de la Leptospirosis.....	3
1.2.3.	Diagnóstico.....	5
1.3.	Leptospirosis a nivel mundial	6
1.3.1.	Leptospirosis en el Ecuador.....	7
1.4.	PCR como herramienta epidemiológica.....	8
2.	Justificación	9
3.	Objetivo General.....	10
3.1.	Objetivos Específicos	10
4.	Descripción del Área de Estudio	11
5.	Materiales	12
5.1.	Colección de muestras de agua del río Chico	12
5.2.	Colección de riñones de rata	12
5.3.	Colección de orina de animales de matadero	12
5.4.	Colección de orina humana	13
5.5.	Colección de sueros sanguíneos humanos	13
5.6.	Extracción de ADN	13
5.7.	Reacciones de PCR en Tiempo Real.....	13
5.8.	Reacciones de PCR Convencional	13
5.9.	Secuenciación y Análisis de muestras.....	14
6.	Métodos	14
6.1.	Recolección de muestras	14
6.1.1.	Muestras de agua de río	14
6.1.2.	Muestras de riñones de rata	15
6.1.3.	Muestras de orina de vacas y cerdos	15
6.1.4.	Muestras clínicas de orina humana de pacientes febriles	16

6.1.5.	Muestras clínicas de sueros sanguíneos de pacientes febriles	16
6.2.	Extracción de ADN	16
6.2.1.	Extracción de ADN de muestras de agua de río.....	16
6.2.2.	Extracción de ADN de muestras de riñones de rata	17
6.2.3.	Extracción de ADN de muestras de orina de animales de camal	18
6.2.4.	Extracción de ADN de muestras de orina humana.....	18
6.2.5.	Extracción de ADN de muestras de sueros sanguíneos.....	19
6.3.	Reacciones de PCR	19
6.3.1.	Reacciones de PCR en tiempo real con cebadores AB/CD.....	19
6.3.2.	Reacciones de PCR en tiempo real con cebadores SecYIV	20
6.3.3.	Reacciones de PCR convencional con cebadores AB/CD y electroforesis....	20
6.3.4.	Reacciones de PCR convencional con cebadores SecYIV.....	21
6.4.	Secuenciación de amplicones que presentaron una señal de amplificación en la PCR convencional y Análisis de secuencias	22
6.5.	Evaluación de la PCR para detectar <i>Leptospira</i> spp.	23
7.	Resultados.....	24
7.1.	Muestras de agua de río.....	24
7.2.	Muestras de riñones de rata.....	24
7.3.	Muestras de orina de animales de matadero.....	24
7.4.	Muestras de orina humana.....	25
7.5.	Muestras de sueros sanguíneos	25
7.6.	Análisis de secuencias.....	25
7.7.	Evaluación de la técnica de detección de <i>Leptospira</i> spp., con cebadores AB/CD26	
8.	Discusión	28
9.	Conclusiones.....	36
10.	Recomendaciones	37
11.	Bibliografía.....	39
12.	Tablas.....	46
13.	Figuras	48
14.	Anexos.....	53

Índice de Tablas

Tabla 1. Especies del género *Leptospira* identificadas en las muestras analizadas.. 46

Tabla 2 Muestras positivas para la presencia de ADN de *Leptospira*, especie identificada en cada muestra y su correspondiente porcentaje de homología con secuencias del GenBank correspondientes al género *Leptospira*. 47

Índice de Figuras

Figura 1 Porcentaje de grupos bacterianos identificados a partir de la secuencia de ADN amplificada en muestras recolectadas durante el presente estudio (PCR convencional con los cebadores AB/CD).....	48
Figura 2. Árbol filogenético, analizado por Máxima Parsimonia con secuencias que presentaron una señal de amplificación en la PCR convencional pero no identificadas como parte del clado Leptospiraceae (<i>Leptonema illini</i> y <i>Leptospira</i> spp.).....	49
Figura 3. Análisis del Ct (Ciclo umbral) de las muestras positivas para PCR en tiempo real con cebadores AB.....	50
Figura 4. Análisis del Ct (Ciclo umbral) de las muestras positivas para PCR en tiempo real con cebadores CD.....	51
Figura 5 Porcentaje de grupos bacterianos identificados a partir de la secuencia de ADN amplificada a partir de las muestras recolectadas para el trabajo de disertación de Jorge Chiriboga (2014) (PCR en tiempo real con los cebadores AB/CD).....	52

Índice de Anexos

Anexo 1 Secuencias de cebadores utilizados en la detección de especies de <i>Leptospira</i>	53
Anexo 2 Mezcla de AB/CD utilizando EvaGreen para PCR en Tiempo Real.	54
Anexo 3 Mezcla de reamplificación AB/ CD utilizando GoTaq en PCR convencional.	55

1. Introducción

1.1. Características del género *Leptospira*

Las leptospiras pertenecen al grupo de las espiroquetas, un filo antiguo del dominio *Bacteria* (Paster, et al., 1991). Este grupo está caracterizado por tener una morfología helicoidal fuertemente enrollada con uno o ambos extremos puntiagudos en forma de gancho (Li, et al., 2000). Pueden llegar a medir 6-20 μm de longitud y 0.1 μm de diámetro (Levett, 2001; Faine, et al., 1999). Las leptospiras tienen gran motilidad debido a que poseen dos flagelos periplásmicos (Swain, 1957; Trueba, et al., 1992; Picardeau & Brenot, 2001).

Las especies del género bacteriano *Leptospira* son aerobias obligatorias de lento crecimiento a temperaturas óptimas de 30 °C. Este género tiene la capacidad de producir catalasa y oxidasa (Levett, 2001). Pueden crecer en medios de cultivo enriquecidos con vitaminas B2 y B12, ácidos grasos de cadena larga y sales de amonio (Johnson & Faine, 1984).

Según la clasificación molecular, se ha identificado 21 especies distribuidas en tres grupos: especies saprofíticas, especies patógenas y especies intermedias. Dentro de las especies saprofíticas se encuentran: *L. biflexa*, *L. wolbachii*, *L. kmetyi*, *L. meyeri*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae*, *L. yanagawae* (Ko, et al., 2009) y *L. idonii* (Saito, 2012). Las especies patógenas son: *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. alexanderi* y *L. alstoni* (Ko, et al., 2009). Las especies intermedias son: *L. inadai*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. wolffii* y *L. licerasiae* (Ko, et al., 2009). La información obtenida a partir de la secuenciación de los genomas completos de *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* y *L. biflexa* ha permitido conocer más acerca de la patogénesis del género *Leptospira* y de su diversificación

en distintos hospedadores (Ren, 2003; Nascimento, 2004; Bulach, 2006; Picardeau, 2008). El contenido de GC (guanina/citosina) del género *Leptospira* oscila entre 35-41%, y todas las especies poseen dos cromosomas circulares de aproximadamente 4Mb y 300kb (Picardeau, 2008).

1.2. Leptospirosis

La leptospirosis es una zoonosis infecciosa causada por varias especies del género *Leptospira* (Ko, et al., 2009). La enfermedad se encuentra distribuida a nivel mundial y ocurre principalmente en zonas tropicales y comunidades de escasos recursos. La ausencia de alcantarillado y condiciones limitadas de higiene incrementan el riesgo de contraer la enfermedad (McBride, et al., 2005). Debido a que los síntomas son poco específicos y no todos los casos de leptospirosis son diagnosticados, se corre el riesgo de subestimar el número de casos anuales de la enfermedad. Los datos más recientes indican que existen aproximadamente 1.7 millones de casos humanos anuales de leptospirosis severa a nivel mundial (Grace, et al., 2012).

Hoy en día la leptospirosis ha adquirido gran importancia debido al incremento de casos en zonas tropicales. El estudio de la epidemiología de la leptospirosis podría incrementar la prevención de la enfermedad, a pesar de que aún se desconocen detalles relacionados a la patogénesis de la bacteria (Pappas, et al., 2008).

1.2.1. Epidemiología y Vías de Contagio

La leptospirosis es una zoonosis, es decir, una enfermedad que puede ser transmitida a partir de animales a humanos. Dentro del ciclo de vida de la bacteria, un mamífero en estado crónico de infección actúa como reservorio de la enfermedad. Una vez infectados, animales

domésticos y salvajes, pueden excretar leptospiras por el resto de la vida en su orina. De esta manera, la transmisión de la enfermedad hacia humanos se da a través del contacto directo con orina infectada o por contacto con suelo o agua contaminados por dicha orina (Ko, et al., 2009). Se ha reportado que los reservorios más importantes que contribuyen a la diseminación de la leptospirosis son los roedores (Faine, et al., 1999; Vijayachari, 2008). Las leptospiras pueden penetrar la piel, especialmente en regiones con abrasiones o heridas. También pueden ingresar al organismo a través de membranas mucosas (Faine, et al., 1999). Por este motivo, cualquier actividad que involucre el contacto con orina u órganos infectados, o contacto con agua o suelo contaminados constituye un factor de riesgo para contraer la enfermedad. Como consecuencia, la leptospirosis en humanos puede ser causada por exposición ocupacional, recreacional o accidental (McBride, et al., 2005; Levett, 2001).

1.2.2. Sintomatología de la Leptospirosis

Las leptospiras pueden colonizar un amplio rango de animales principalmente mamíferos y marsupiales. Los humanos son considerados hospedadores accidentales (Bharti, et al., 2003). En los animales hospedadores puede producir infección sistémica y daños en múltiples tejidos. Por otro lado, los animales reservorio son generalmente asintomáticos y presentan una infección persistente en los túbulos renales que los hace responsables de mantener la transmisión (Levett, 2001). Las infecciones humanas se dan principalmente por contacto con orina de animales infectados. Por este motivo las ratas constituyen el principal reservorio debido a su amplia distribución (Scialfa, et al., 2010). Las ratas infectadas no presentan síntomas clínicos, sin embargo algunas pueden exhibir alteraciones morfológicas en los riñones como nefritis intersticial debido a la adhesión de bacterias al lumen de los túbulos renales (Tucunduva de Faria, et al., 2007; Thiermann, 1981). La infección en ganado vacuno,

porcino, ovino y caprino puede causar abortos en los hospedadores (Rusbridge, et al., 2004). También se ha reportado uveítis recurrente en caballos relacionado a infecciones con bacterias del género *Leptospira* (Faber, et al., 2000).

En humanos, la leptospirosis produce un amplio rango de síntomas. Desde una infección subclínica con síntomas no específicos, hasta una infección multiorgánica severa con alta tasa de mortalidad (Levett, 2001). Los síntomas característicos de la etapa inicial de la leptospirosis son similares a los de la gripe común (fiebre, escalofríos, cefalea, mialgia, dolor abdominal). Generalmente se resuelven luego de aproximadamente 10 días. Sin embargo la enfermedad puede manifestarse de manera severa y multiorgánica, resultando en la enfermedad de Weil o el Síndrome Severo Hemorrágico Pulmonar (McBride, et al., 2005; Levett, 2001).

La presentación clínica de la leptospirosis es bifásica, presentando una fase septicémica y una fase inmunológica. En los primeros días de la infección (7-10 días) la bacteria se encuentra en el torrente sanguíneo, lo que se conoce como septicemia o leptospiremia y puede ser detectada por cultivo (Levett, 2001). La segunda etapa de la enfermedad se caracteriza por la presencia de anticuerpos como parte de la respuesta inmune para eliminar a la bacteria del organismo hospedador. Durante esta última etapa, el paciente puede desarrollar fallo multiorgánico que incluye daño hepático (causante de ictericia), deficiencia renal, entre otras (Utzinger, et al., 2012). Varios reportes indican manifestaciones pulmonares y respiratorias severas durante dicha fase (Helmerhorst, et al., 2012). También se ha reportado infecciones en el sistema nervioso como meningitis o meningoencefalitis, y se ha encontrado presencia de la leptospiras en infecciones oculares (Levett, 2001; Utzinger, et al., 2012).

1.2.3. Diagnóstico

Debido al amplio espectro de síntomas de la leptospirosis, es común el diagnóstico tardío o erróneo de la enfermedad. La leptospirosis puede ser confundida con otras enfermedades febriles como el dengue, hepatitis y neumonías (Plank & Deborah, 2000). La “prueba de oro” (gold standard) es el MAT (Microscopic Agglutination Test). Esta es una prueba serológica basada en la detección de anticuerpos específicos producidos por el sistema inmune del paciente contra antígenos de *Leptospira* spp. (Faine, 1982; Faine, et al., 1999; Levett P, 2001). En humanos, los anticuerpos pueden ser detectados a partir del séptimo día después del apareamiento de los síntomas. Esto limita la eficiencia de los análisis serológicos para un diagnóstico temprano. Por otro lado, las leptospiras son eliminadas de la sangre a partir del décimo día de enfermedad como consecuencia de la respuesta inmune. A pesar de que el costo del MAT es bajo, los laboratorios que lo realizan requieren mantener cultivos de *Leptospira* como fuente de antígeno además de actualizar constantemente los serogrupos cultivados (Organización Mundial de la Salud, 2008).

El aislamiento de leptospiras a partir de muestras clínicas también es considerado una alternativa de diagnóstico. Sin embargo este método requiere medios de cultivo especiales y tiempos de incubación prolongados (incluso semanas) debido al demandante metabolismo característico del género *Leptospira*. Además las leptospiras vivas se encuentran en baja concentración en muestras clínicas por lo cual es necesario tomar varias muestras para obtener un resultado fiable (Levett, et al., 2005; Wuthiekanun, et al., 2007). La sensibilidad del cultivo es baja comparado con otras pruebas de detección. Wuthiekanun et al., (2007) reportó que la técnica de cultivo de leptospiras para muestras de sangre humana detectó 62.7% (52/83) de pacientes ya diagnosticados con leptospirosis.

Dentro de otros métodos de diagnóstico se encuentran pruebas de ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) y SAT (Slide agglutination test) que son utilizados para detectar anticuerpos. Estas técnicas tienen un bajo porcentaje de precisión (Faine, et al., 1999). También se puede detectar presencia de *Leptospira* spp., a través de Tinción Inmunofluorescente (Sheldon, 1953), Tinción con Inmunoperoxidasa (Terpstra, et al., 1983), o Hibridación de ADN (Terpstra, et al., 1986). Estos métodos no son muy utilizados hoy en día debido a su baja sensibilidad.

En la actualidad, la PCR (Polymerase Chain Reaction por sus siglas en inglés) es considerada una técnica rápida y eficaz especialmente en pacientes con leptospirosis crónica y aguda. En los últimos años se ha descrito varios ensayos de PCR en Tiempo Real que han permitido la detección de leptospiras en distintos tipos de muestras en laboratorios de diagnóstico y de referencia. Además utilizando PCR en tiempo real es posible detectar bajas concentraciones de ADN en las muestras (Smith, et al., 2001). Estas técnicas moleculares son de gran importancia en la investigación de brotes pues representan herramientas rápidas y sensibles para la detección de patógenos (Klein, 2002).

1.3. Leptospirosis a nivel mundial

La leptospirosis es una enfermedad distribuida a nivel global, sin embargo tiene mayor incidencia en regiones subtropicales de clima húmedo. Generalmente el número de infectados aumenta en temporadas lluviosas (Organización Mundial de la Salud, 2008; Levett, 2005).

A pesar de que la incidencia de leptospirosis ha disminuido en los países desarrollados, continúa siendo un problema de salud pública emergente en los países en vías de desarrollo.

Tal es el caso de Brasil, Guatemala, Perú, Ecuador, entre otros (Organización Mundial de la Salud, 2000).

La enfermedad se puede encontrar en ambientes urbanos y rurales. El riesgo de contraer leptospirosis es mayor en áreas urbanas de países en vías de desarrollo debido a la ausencia de sistemas de alcantarillado eficientes, improvisación de canales, grandes poblaciones de ratas, entre otros. Por otro lado, en las áreas rurales los agricultores representan un grupo de alto riesgo al estar en constante contacto con animales portadores (Levett, 2005; Tilahun, et al., 2013).

1.3.1. Leptospirosis en el Ecuador

Ecuador se encuentra dentro de los países con mayor incidencia de leptospirosis, ocupando el puesto 18 a nivel internacional (Pappas, et al., 2008). Los primeros casos de formas hemorrágicas de leptospirosis en Ecuador fueron reportados en Guayaquil por Hideyo Noguchi a principios del siglo XX (Noguchi, 1919). Durante la estación lluviosa de 1997-1998 se presentaron 338 casos a nivel nacional, especialmente en las ciudades costeras que experimentaron un intenso ENSO (El Niño/Oscilación Sur). Los casos en Guayaquil estuvieron asociados con hospitalización debido a formas severas de leptospirosis y una alta mortalidad (19/52) (OPS; CEPIS, 2003).

En el 2012, la provincia de Manabí reportó un incremento en casos seropositivos para IgM específico de *Leptospira* spp., (1 012 pacientes) en relación a los años 2010 y 2011 cuando se reportó 436 y 487 casos respectivamente. Aproximadamente el 50% de los casos provinieron de los meses de abril a julio del año analizado (INSPI-Portoviejo, 2013). Estos datos sugieren un incremento de leptospirosis en la provincia de Manabí, concentrados en el cantón

Portoviejo. Por lo tanto se evidenció la necesidad de realizar monitoreos constantes de fuentes de agua, animales y muestras humanas que permitan entender de mejor manera la epidemiología de la leptospirosis en este cantón.

1.4. PCR como herramienta epidemiológica

El diagnóstico de leptospirosis anteriormente se basaba en el aislamiento de leptospiras a partir de cultivos o por análisis serológicos. Ambas técnicas permiten un diagnóstico tardío y poco sensible de la presencia de leptospiras (Levett, et al., 2005).

La aplicación de métodos independientes del cultivo como la PCR ha permitido a los investigadores acelerar el proceso de identificación y detección del microorganismo. Esto a través del análisis de genes específicos del género *Leptospira* como secuencia blanco sin necesidad de cultivo (Qiu, et al., 2001).

Hoy en día se han estandarizado varios ensayos de PCR convencional. Sin embargo éstos presentan limitaciones que han restringido su utilización en el campo de diagnóstico. Por otro lado, los ensayos de PCR en tiempo real presentan un potencial de detección más rápido y sensible en infecciones agudas y crónicas (Levett, et al., 2005). La PCR en tiempo real se ha convertido en una herramienta útil que permite detectar bajas cantidades del patógeno en diversos tipos de muestras y monitorear enfermedades microbianas de manera eficiente.

La presente investigación muestra los resultados de un estudio piloto de leptospirosis en el cantón Portoviejo (Manabí). Mediante el análisis de secuencias de ADN se logró determinar las especies de *Leptospira* presentes en cada muestra. Se detectó e identificó especies de *Leptospira* patógena e intermedia en reservorios animales de la enfermedad y en fuentes de

agua natural. Finalmente, se determinó la especificidad de la PCR en tiempo real utilizada mediante el análisis del ciclo umbral.

2. Justificación

La leptospirosis es considerada una de las zoonosis más diseminadas a nivel mundial (Organización Mundial de la Salud, 2011). El cambio climático junto con factores antropogénicos como densidad poblacional, sistemas de saneamiento, entre otros pueden afectar la transmisión y la dinámica de enfermedades infecciosas, incluida la leptospirosis (McCarthy, et al., 2001; Lau, et al., 2010).

La provincia de Manabí es considerada una localidad endémica de esta enfermedad. Los datos recopilados por el Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación (INSPI) durante el 2012 corroboran la circulación de leptospiras a partir de historias clínicas y datos de serología (Pinargote, 2012). Estos datos evidencian la necesidad de realizar programas de monitoreo constante de la enfermedad en el cantón Portoviejo. Pero para comprender la epidemiología de la leptospirosis, es importante detectar e identificar la especie de *Leptospira* que circula en los animales portadores y en muestras ambientales.

Los resultados de esta investigación pretenden ampliar el conocimiento relacionado con la leptospirosis en nuestro país brindando bases para estudios futuros. La determinación de los factores de riesgo involucrados en la transmisión de la leptospirosis es un aporte importante a tomar en cuenta para la prevención de dicha enfermedad en zonas con alta incidencia de nuestro país. Esto puede lograrse solamente detectando al patógeno en las diferentes fuentes a partir de las que el ser humano puede infectarse. El presente estudio aplicó las técnicas

moleculares para identificar especies de *Leptospira* en suero humano, muestras de animales domésticos y muestras ambientales en el cantón Portoviejo.

Adicionalmente, es importante tomar en cuenta que Portoviejo es una zona de nuestro país donde circulan al mismo tiempo varias enfermedades febriles: ej. Malaria, Dengue (INSPI-Portoviejo, 2013). La co-circulación de estas enfermedades, que producen sintomatología febril similar a la leptospirosis, incrementa la posibilidad de que el paciente sea tratado inadecuadamente como consecuencia de un diagnóstico erróneo. Esto acrecienta la necesidad de desarrollar y estandarizar técnicas que permitan detectar a tiempo la enfermedad.

Además, el presente trabajo determina la especificidad de la PCR en tiempo real utilizada en el Laboratorio de Microbiología de la USFQ de tal manera que fortalece la técnica de detección molecular de *Leptospira*.

3. Objetivo General

- Desarrollar un estudio piloto que permita monitorear la transmisión de leptospirosis en el cantón Portoviejo (Manabí) mediante la detección e identificación de especies de *Leptospira* patógena e intermedia en reservorios animales de la enfermedad, fuentes de agua natural y ser humano.

3.1. Objetivos Específicos

- Detectar la presencia de especies de *Leptospira*, en muestras de sueros de pacientes febriles recolectados por el INSPI (Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación) durante la estación lluviosa del 2013, mediante técnicas de PCR en tiempo real y convencional.

- Detectar la presencia de especies de *Leptospira* patógena e intermedia en muestras de agua del Río Chico (Cantón Portoviejo), utilizando técnicas de PCR en tiempo real y convencional.
- Detectar la presencia de especies de *Leptospira* patógena e intermedia en muestras de orina de animales domésticos (bovinos y suinos) y no domésticos (ratas) del cantón Portoviejo, mediante técnicas de PCR en tiempo real y convencional.
- Identificar las especies de *Leptospira* mediante el análisis de las secuencias obtenidas a partir de los amplicones de los PCRs mencionados en los objetivos anteriores.
- Evaluar la técnica de PCR con los cebadores publicados por Merien et al., (2005) y modificada en la tesis de Jorge Chiriboga et al., (2014) para ser utilizada de manera rutinaria en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

4. Descripción del Área de Estudio

Este estudio se enfocó en la identificación de especies de *Leptospira* en el cantón Portoviejo. Las muestras clínicas de suero sanguíneo humano provenientes del INSPI Portoviejo, las muestras de orina humana recolectadas en el Subcentro de Salud de Calderón, las muestras de orina de animales de camal faenados en Riochico y Calderón, las muestras de riñones de rata y las muestras de agua del río Chico fueron tomadas durante la estación lluviosa del 2013. En el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito se realizó la extracción de ADN de las respectivas muestras, su diagnóstico molecular con PCR en tiempo real, PCR convencional y el análisis de las secuencias para la identificación de especies del género *Leptospira*.

5. Materiales

5.1. Colección de muestras de agua del río Chico

- Muestras de agua de río
- Embudo plástico
- Jarra plástica
- Algodón sintético de fibras de nylon
- Tubos cónicos estériles de 50mL (Axygen, Inc.)
- Mechero Bunsen
- Pinzas estériles
- Centrífuga Centra MP4 (IEC)
- Filtros de nitrocelulosa (Millipore Corporation)

5.2. Colección de riñones de rata

- Trampas de rata Pretul
- Mandiles estériles desechables
- Kit de disección Prestige
- Tubos cónicos estériles de 50mL (Axygen, Inc.)
- Centrífuga Centra MP4 (IEC)
- Alcohol 70%

5.3. Colección de orina de animales de matadero

- Jeringuilla 10mL
- Tubos cónicos estériles de 50mL (Axygen, Inc.)
- Alcohol 70%

- Centrífuga Centra MP4 (IEC)
- Mandiles estériles desechables

5.4. Colección de orina humana

- Frascos estériles de orina

5.5. Colección de sueros sanguíneos humanos

- Viales
- Contenedor plástico con hielo
- Geles de refrigeración

5.6. Extracción de ADN

- Kit de extracción FastADN SPIN Kit for Soil (Qbiogene)
- Kit de extracción de ADN QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen)
- Vortex (Labnet International, Inc.)
- Microcentrifuga (Eppendorf)
- Tubos de 1.5mL (Axygen, Inc.)
- CTAB

5.7. Reacciones de PCR en Tiempo Real

- Kit iQ SYBR Kit (BioRad)
- Cebadores (Invitrogen)
- Termociclador para PCR tiempo real CFX96 (BioRad)

5.8. Reacciones de PCR Convencional

- Agua para PCR (Gibco)
- dNTP Mix (Invitrogen)

- Taq Platinum ADN Polymerase (Invitrogen)
- Suero de Albumina Bovina acetilado para biología molecular (BSA) (Promega)
- Termociclador T-100 (BioRad)
- Cebadores (Invitrogen)

5.9. Secuenciación y Análisis de muestras

- Archivos de Secuenciación remitidos por Functional Biosciences, Inc. (Wisconsin, EEUU)
- Software para alineamiento múltiple Molecular Evolutionary Genetics Analysis MEGA5.0
- Software en línea para alineamientos de secuencias contra bases de datos Basic Local Alignment Search Tool-BLAST (NCBI)
- Base de Datos GenBank®

6. Métodos

6.1. Recolección de muestras

6.1.1. Muestras de agua de río

Las muestras de agua de río analizadas en este proyecto (n=4) se colectaron en el Río Chico (Manabí) entre Marzo del 2013 y Junio del 2013. El sitio de colección fue elegido por su cercanía a la comunidad de Abdón Calderón (Portoviejo-Manabí). La toma de muestra se realizó mediante la metodología utilizada previamente por Gutiérrez et al.,(2013). Se filtraron 16 litros de agua de río recogidos de profundidad no mayor a 10 cm de la superficie del flujo del río. Las muestras de agua fueron filtradas a través de algodón sintético de nylon

estéril instalado en un embudo esterilizado con hipoclorito de sodio 4.5%. Una vez terminado el filtrado, el algodón de nylon fue transferido al interior de un tubo cónico estéril de 50 mL al cual se le añadió 10 mL de agua del río sin filtrar para su transporte. Los tubos cónicos se transportaron en contenedores con hielo, manteniendo una temperatura aproximada de 4°C desde el sitio de colecta hasta su transporte al Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito donde fueron congeladas a -20°C.

6.1.2. Muestras de riñones de rata

Las muestras de riñones de rata fueron colectadas en zonas cercanas al cantón Portoviejo entre Abril del 2013 y Junio del 2013 gracias a la gestión de la Dra. Soraya Reyes (médico veterinario), quien para ese momento era directora encargada del SNEM (Servicio Nacional de Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores Artrópodos). Las ratas (n=80) fueron atrapadas utilizando trampas de madera marca Pretul de 177.8mm de largo. Las trampas fueron entregadas a habitantes voluntarios de la comunidad para que las coloquen cerca a madrigueras, zonas con vegetación aledaña, y cerca de desagües de aguas residuales o alcantarillas. Los individuos colectados fueron entregados a la Dra. Soraya Reyes, quien realizó la extracción de los riñones. Los riñones fueron colocados en etanol al 70% y transportados a 4°C hacia el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito en donde fueron conservadas a -20°C.

6.1.3. Muestras de orina de vacas y cerdos

Las muestras de orina de animales de matadero fueron colectadas en los camales de Riochico y Calderón, en el cantón Portoviejo, durante Marzo del 2013 y Junio del 2013. En el camal de Riochico se colectaron 18 muestras de orina de cerdo, y 2 muestras de orina de vaca. En el camal de Calderón se colectó 12 muestras de orina de cerdo y 24 muestras de orina de

vaca. Las vejigas de cerdos y vacas fueron extraídas por trabajadores de los mataderos. Las muestras de orina (15-40mL) fueron extraídas a través de una punción directa a la vejiga del animal luego de esterilizar el sitio de punción con etanol al 70%. A continuación se transportó las muestras en un contenedor con hielo para mantener una temperatura aproximada de 4°C durante su transporte al Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito. Posteriormente, las muestras fueron almacenadas a -20°C.

6.1.4. Muestras clínicas de orina humana de pacientes febriles

Las muestras clínicas de orina humana (50-100mL) fueron colectadas a partir de pacientes febriles (n=5), por el personal del Laboratorio del Subcentro de Salud de Abdón Calderón durante los meses de Marzo, Abril y Mayo del 2013. Posteriormente fueron transportadas a 4°C hacia el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito, en donde fueron almacenadas a -20°C.

6.1.5. Muestras clínicas de sueros sanguíneos de pacientes febriles

Las muestras clínicas de sueros sanguíneos utilizadas para este estudio provienen de pacientes febriles. Los sueros (n=154) fueron recolectadas por el Laboratorio del INSPI-Portoviejo. Las muestras fueron colectadas durante los meses de Marzo, Abril y Mayo del 2013 en el cantón Portoviejo-Manabí, almacenadas en la congeladora del INSPI-Portoviejo y transportadas en hielo, por vía aérea, al Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito. Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su procesamiento.

6.2. Extracción de ADN

6.2.1. Extracción de ADN de muestras de agua de río

Antes de realizar la extracción de ADN, las muestras de agua fueron descongeladas. El algodón sintético de nylon fue exprimido dentro del tubo para liberar todas las células

bacterianas atrapadas en la matriz. El agua restante se filtró a través de un filtro de nitrocelulosa de 0.45µl (Millipore Corporation, Massachusetts), toda la noche por decantación. El sedimento obtenido fue utilizado para la extracción con el Kit FastDNA SPIN Kit for Soil (Qbiogene, California), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para conservar y optimizar el ADN extraído de las muestras de agua de río, el volumen total de 50µL obtenido fue dividido en dos alícuotas del mismo volumen (20µL) y otra alícuota con el contenido restante (10µL) denominándolas A, B y C con el respectivo código de muestra. El ADN fue almacenado a -20° C.

6.2.2. Extracción de ADN de muestras de riñones de rata

Se contó con 80 muestras de riñones de rata capturadas en las cercanías del cantón Portoviejo. Cada riñón fue cortado en pequeños trozos de 2mm, los trozos fueron colocados en un micro tubo de 1.5 ml junto con 1000µl de PBS 1X. Los pedazos cortados fueron macerados y la solución se centrifugó 5 minutos a 3000rpm para obtener el pellet celular. Luego se aspiró el PBS y se agregó un nuevo volumen de 1000 µl de PBS, el pellet se resuspendió y se centrifugó nuevamente. Después de repetir este proceso tres veces, se digirió el pellet celular en 700 µl de solución CTAB, se incubó durante dos horas a 65°C agitando las muestras cada 15 minutos. A continuación se agregó 700 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló hasta obtener una emulsión. Las muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos a 12000 rpm para separar las fases de la solución, luego se tomó 500 µl de la fase superficial a un nuevo Eppendorf sin tocar la interfase para evitar contaminación. Para precipitar el ADN de la solución acuosa se agregó 50 µl de Acetato de Sodio 3M pH 5 y 1000 µl de etanol al 100% a temperatura de hielo, se dejó reposar las muestras durante toda la noche a -20°C. Al

día siguiente se centrifugó a 14 000rpm por 10 minutos, se visualizó el pellet de ADN y se descartó el sobrenadante. Se realizó tres lavados con etanol al 70% y finalmente se resuspendió el pellet con 50 μ l de TE (Bermeo, 2012; Murray & Thompson, 1980). Para conservar y optimizar el ADN extraído de las muestras, el volumen total fue dividido en dos alícuotas del mismo volumen (20 μ L) y otra alícuota con el contenido restante (10 μ L) denominándolas A, B y C con el respectivo código de muestra. El ADN fue almacenado a -20° C.

6.2.3. Extracción de ADN de muestras de orina de animales de camal

Se dispuso de 56 muestras de orina de animales de camal (cerdos y vacas) recolectadas en las cercanías del cantón Portoviejo. Las muestras fueron descongeladas y centrifugadas a 3000rpm 15 minutos. El pellet obtenido fue resuspendido en 1mL de PBS y se centrifugó a 10 000 rpm 3 minutos. El nuevo pellet celular se resuspendió en 700 μ l de solución CTAB, y se continuó con el mismo procedimiento descrito en la sección 6.2.2. (Baquero, et al., 2010). Para conservar y optimizar el ADN extraído de las muestras, el volumen total de 50 μ L obtenido fue dividido en dos alícuotas del mismo volumen (20 μ L) y otra alícuota con el contenido restante (10 μ L) denominándolas A, B y C con el respectivo código de muestra. El ADN fue almacenado a -20° C.

6.2.4. Extracción de ADN de muestras de orina humana

Se dispuso de 5 muestras de orina humana de pacientes con sintomatología febril procedentes del Laboratorio del Subcentro de Salud de Calderón. Se utilizó el kit de extracción de ADN QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) siguiendo las recomendaciones del fabricante para fluidos corporales. Las muestras fueron descongeladas y centrifugadas durante 15 minutos a 3000rpm previo a ser procesadas con el kit de extracción de ADN. Para conservar y optimizar

el ADN extraído de las muestras de orina, el volumen total de 50µL obtenido fue dividido en dos alícuotas del mismo volumen (20µL) y otra alícuota con el contenido restante (10µL) denominándolas A, B y C con el respectivo código de muestra. El ADN fue almacenado a -20° C.

6.2.5. Extracción de ADN de muestras de sueros sanguíneos

Se dispuso de 154 muestras de suero sanguíneo humano de pacientes con sintomatología febril procedentes del Laboratorio del INSPI-Portoviejo. Se utilizó el kit de extracción de ADN QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante para fluidos corporales. Para conservar y optimizar el ADN extraído de las muestras de suero, el volumen total de 50µL obtenido fue dividido en dos alícuotas del mismo volumen (20µL) y otra alícuota con el contenido restante (10µL) denominándolas A, B y C con el respectivo código de muestra. El ADN fue almacenado a -20° C.

6.3. Reacciones de PCR

6.3.1. Reacciones de PCR en tiempo real con cebadores AB/CD

Las muestras clínicas de suero humano, riñones de rata, orina humana y orina de animales domésticos fueron analizadas utilizando PCR en tiempo real con cebadores AB ([5'-GGCGGCGCGTCTITAAACATG-3'] y [5'-TTCCCCCATTGAGCAAGATT-3']) y CD ([5'-CAAGTCAAGCGGAGTAGCAA-3'] y [5'-CTTAACCTGCTGCCTCCCGTA-3']) (Merien, et al., 1992) para identificar la presencia de bacterias del género *Leptospira* (Anexo 1). La mezcla de amplificación se preparó para un volumen final de 10 µl con 1 µl de ADN de muestra, 0.5 µM de cebadores, 1X Supermix SsoFast EvaGreen (Bio-Rad) y agua libre de DNAsas hasta alcanzar el volumen deseado (Anexo 2). Las muestras fueron incubadas a 95°C durante 3 minutos para su desnaturalización inicial y luego sometidas a 44 ciclos de

desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, alineamiento a 62,5°C durante 30 segundos, extensión de 72°C durante 30 segundos (Merien, et al., 2005). Se utilizó agua libre de DNAsas en lugar de ADN como control negativo y ADN de *Leptospira* spp., como control positivo en cada set de reacciones.

6.3.2. Reacciones de PCR en tiempo real con cebadores SecYIV

El ADN de las muestras de río fueron analizadas utilizando PCR en tiempo real con los cebadores SecYIV ([5'- GCGATTCAGTTTAATCCTGC-3'] y [5'- GAGTTAGAGCTCAAATCTA-3']) (Ahmed, et al., 2009) para detectar la presencia de especies patógenas del género *Leptospira* (Anexo 1). La mezcla de amplificación se preparó para un volumen final de 10 µl con 1 µl de ADN de muestra, 0.4 µM de cebadores, 1X Supermix SsoFast EvaGreen (Bio-Rad) y 0.1mM de BSA (Anexo 3). Las muestras fueron amplificadas dentro de un termociclador programado con las siguientes condiciones: desnaturalización de 10 minutos a 95°C, fase de alineamiento de 54°C durante 5 segundos, extensión de 72°C durante 15 segundos (Ahmed, et al. 2009). Se utilizó agua libre de DNAsas en lugar de ADN de muestras como control negativo y ADN de *Leptospira* spp., como control positivo en cada set de reacciones.

6.3.3. Reacciones de PCR convencional con cebadores AB/CD y electroforesis

Los amplicones de las muestras de sueros y orina humana, orina de animales de camal y riñones de rata que mostraron una señal de amplificación en la PCR en tiempo real se utilizaron para la segunda etapa del análisis con PCR convencional. El objetivo de esta reamplificación fue incrementar la cantidad de amplicón para contar con suficiente material para el secuenciamiento de ADN. Para esto se reamplificó los amplicones obtenidos en la PCR en tiempo real a 30 ciclos más mediante PCR convencional con los mismos cebadores. La

mezcla de amplificación de la reacción de PCR convencional con cebadores AB/CD se preparó para un volumen final de 30 μ l con 1 μ l del amplicón obtenido en la Sección 6.3.1., 1 μ M de cebadores, 1X de Buffer de GoTaq (Promega), 2mM de MgCl₂, 0.2mM de dNTPs, 0.02 U/ μ l de GoFlexi Taq (Promega) y agua libre de DNAsas hasta completar el volumen final (Anexo 2). Las muestras fueron amplificadas dentro de un termociclador programado con las siguientes condiciones: Las muestras fueron incubadas a 94°C durante 3 minutos para su desnaturalización inicial y luego sometidas a 29 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, alineamiento a 63°C durante un minuto y 30 segundos, extensión de 72°C durante 2 minutos (Merien, et al, 1992). Se utilizó agua libre de DNAsas en lugar de ADN de muestras como control negativo y ADN de *Leptospiraspp.*, como control positivo en cada set de reacciones.

Los productos amplificados fueron separados por electroforesis 1% de agarosa a 70V durante 50 minutos visualizados en forma de bandas en los geles de agarosa mediante la aplicación de luz ultravioleta. Previo al PCR convencional, se realizó diluciones 1:10⁶ y 1:10⁷ de los amplicones CD de las muestras de suero humanos.

6.3.4. Reacciones de PCR convencional con cebadores SecYIV

El amplicón de la muestra de agua de río que mostró una señal de amplificación en la PCR en tiempo real, se reamplificó en PCR convencional. El objetivo de esta segunda etapa fue incrementar la cantidad de amplicón para contar con suficiente material para el secuenciamiento de ADN. Para esto se reamplificó al amplicón obtenido en la PCR en tiempo real a 30 ciclos más mediante PCR convencional con los mismos cebadores. La mezcla de amplificación de la reacción de PCR convencional con cebadores SecYIV se preparó para un volumen final de 30 μ l con 1 μ l del amplicón obtenido en sección 6.3.2., 0.4 μ M de cebadores,

1X de Buffer de reacción, 6mM de MgCl₂, 400µM de dNTPs, 0.0125 U/µl de polimerasa Taq Platinum (Invitrogen, Massachusetts) y agua libre de DNAsas hasta completar el volumen final. Las muestras fueron amplificadas dentro de un termociclador programado con las siguientes condiciones: denaturación inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos con denaturación a 95°C por 5 segundos, temperatura de hibridación de 54°C por 30 segundos y una extensión a 72°C por 15 segundos. Finalmente se incorporó un paso a 95°C por 2 minutos seguido de 1 minuto a 20°C.

Se utilizó agua libre de DNAsas en lugar de ADN de muestras como control negativo y ADN de *Leptospira spp.*, como control positivo en cada set de reacciones. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis 1% de agarosa a 70V durante 50 minutos y fueron detectados por visualización de bandas en los geles de agarosa.

6.4. Secuenciación de amplicones que presentaron una señal de amplificación en la PCR convencional y Análisis de secuencias

Las muestras de sueros y orina humana, orina de animales de camal, riñones de rata y agua de río Chico que presentaron una señal de amplificación en la reamplificación en PCR convencional, fueron enviadas a secuenciar a Functional Biosciences (Wisconsin, EEUU). Se utilizó el programa MEGA5.1 (Tamura, et al., 2011) para alinear las secuencias y se comparó las secuencias obtenidas con las secuencias de especies bacterianas pertenecientes al género *Leptospira* contenidas en la base de datos GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Se tomaron las secuencias de las muestras que presentaron una señal de amplificación durante la reamplificación en PCR convencional pero que no tenían homología con el género *Leptospira* y se realizó una comparación de esas secuencias en BLAST para conocer a qué organismos

pertenecían(Figura 1). Conjuntamente se realizó un análisis filogenético utilizando el método de Máxima Parsimonia con las secuencias de las muestras de suero humano que presentaron una señal de amplificación durante la reamplificación en PCR convencional pero que no habían presentado homología con el género *Leptospira* con el fin de confirmar este resultado (Figura 2). Para la construcción del árbol se utilizó secuencias del ARN 16S ribosomal del género *Leptospira* extraídas de la base de datos del NCBI: *Leptospira biflexa*, *Leptospira interrogans* y *Leptospira fainei*. Además se escogió la especie *Leptonema illini* como grupo externo.

6.5. Evaluación de la PCR para detectar *Leptospira* spp.

Para este análisis se utilizó la PCR diseñada por Merien et al. (2005) y optimizada en tiempo real por Chiriboga et al., (2014) junto con los datos de Ct (Cycle threshold). Con el fin de identificar la especificidad de la PCR en tiempo real al utilizar los cebadores A/B y C/D, se evaluó los resultados del presente estudio junto con los resultados obtenidos por Chiriboga et al.,(2014). Se entiende como especificidad de un ensayo a la habilidad de detectar la secuencia de interés excluyendo a otras secuencias (Araujo, 2008). El análisis utilizó un total de 56 muestras de orina de animales de camal, 80 muestras de riñones de rata, 231 muestras de suero humano y 5 muestras de orina humana. Se cuantificó el número de muestras que presentaron una señal de amplificación en la PCR en tiempo real, confirmadas en la reamplificación en PCR convencional y finalmente reafirmadas como parte del género *Leptospira* después de la secuenciación. Estos datos fueron comparados con el valor de Ct de las muestras analizadas (Figura 3 y 4).

7. Resultados

7.1. Muestras de agua de río

La PCR en Tiempo Real con cebadores SecYIV detectó la amplificación de 1 de 4 (Tabla 1) muestras perteneciente al río Chico colectada en el mes de Abril del año 2013. Este resultado fue confirmado con la reamplificación en PCR convencional. El amplicón positivo se envió a secuenciar y se identificó como *L. kirschneri* (Tabla 2).

7.2. Muestras de riñones de rata

Se procesaron 80 muestras de riñones de rata capturadas dentro del cantón Portoviejo, de éstas, el 46% de las muestras (37/80) presentaron una señal de amplificación en la PCR en tiempo real con los cebadores AB/CD. Solo el 23% (18/80) de las muestras presentaron bandas correspondientes en la reamplificación con PCR convencional. Una vez secuenciados los amplicones, únicamente el 8.8% (7/80) mostraron secuencias homólogas a *Leptospira* (Tabla 1). La secuenciación permitió identificar *L. borgpetersenii* (4 muestras), *L. noguchii* (2 muestras) y *L. wolffii* (1 muestra) (Tabla 2).

7.3. Muestras de orina de animales de matadero

Se analizó 56 muestras de orina de animales de matadero (30 de cerdos y 26 de vacas). El 82% de las muestras (46/56) presentó una señal de amplificación en la PCR en tiempo real con los cebadores AB/CD. Solo el 38% (21/56) de las muestras mostró bandas correspondientes en la reamplificación en PCR convencional. Una vez secuenciados los amplicones de estas 21 muestras, el 17.9% (10/56) tuvo homología con *L. borgpetersenii* (7 muestras), *L. wolffii* (2 muestras), *L. interrogans* (1 muestra) (Tabla 1 y 2).

7.4. Muestras de orina humana

Se analizó 5 muestras de orina humana con los cebadores AB/CD para determinar la presencia del género *Leptospira*. Solamente una de las muestras presentó una señal de amplificación en la PCR en tiempo real (Tabla 1). La muestra fue confirmada en la reamplificación en PCR convencional. La secuencia obtenida tuvo alta homología con la especie *L. santarosai* (Tabla 2).

7.5. Muestras de sueros sanguíneos

De las 154 muestras, provenientes de pacientes febriles, analizadas por PCR en tiempo real con los cebadores AB/CD el 67% (103/154) presentó una señal de amplificación. Solo el 15% (23/154) de las muestras fueron confirmadas en la reamplificación en PCR convencional. Los amplicones CD de las muestras de sueros sanguíneos presentaron bandas inespecíficas como resultado de la PCR convencional. Debido a esto se realizó diluciones de los amplicones del PCR en tiempo real para obtener bandas más claras. Después de la secuenciación, no se identificó amplicones con secuencias homólogas a especies del género *Leptospira* (Tabla 1).

7.6. Análisis de secuencias

Se enviaron a secuenciar 66 amplicones de los cuales únicamente el 28.8% (19/66) tuvo homología con el género *Leptospira* (*L. borgpetersenii*, *L. wolffii*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. kirschneri*, *L. interrogans*). El 71.2% de los amplicones restantes, pese a mostrar las bandas correspondientes a los productos esperados en la reamplificación en PCR convencional, no evidenciaron homología con el género *Leptospira* al confrontarlas con la base de datos del GenBank. La mayoría de las secuencias enviadas a secuenciar (35%, 23/66) presentó homología con "Bacterias Incultivables", 17% (11/66) de las secuencias no presentó homología con secuencias del GenBank, 9% (6/66) de las secuencias tuvo homología con

ADN del hospedero y 11% (7/66) presentó homología con especies bacterianas ambientales: *Collinsella* spp. (4/66), *Olsenella* (2/66) y *Campylobacter jejuni* (1/66) (Figura 1). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Chiriboga et al., (2014) donde se secuenció 24 amplicones que presentaron una señal de amplificación tanto en la PCR en tiempo real como en la PCR convencional con los cebadores AB/CD. Los resultados de esta investigación mostraron un 29% (7/24) de los amplicones correspondía a *Leptospira wolffii*, 4% (1/24) a *Leptospira* spp., el 67% (16/24) de los amplicones restantes pese a mostrar las bandas correspondientes a los productos esperados no evidenciaron similitud con el género *Leptospira* al confrontarlas con la base de datos del GenBank. La mayoría de las secuencias no *Leptospira* (42%, 10/24) presentaron homología con “Bacterias Incultivables” y 25% (6/24) de las secuencias no fueron homólogas con secuencias del GenBank (Figura 5).

El análisis filogenético molecular utilizando el método Máxima Parsimonia con las secuencias obtenidas a partir de las muestras de suero humano de pacientes febriles mostró que éstas efectivamente no se agruparon junto con las especies del género *Leptospira*. Por lo tanto se descartó que correspondieran a este género (Figura 2).

7.7. Evaluación de la técnica de detección de *Leptospira* spp., con cebadores AB/CD

Los cebadores AB fueron utilizados para analizar 372 muestras, especificadas en la Sección 6.5. Aproximadamente 32.3% (120/372) de las muestras presentaron una señal de amplificación en la PCR en tiempo real, 15.9% (59/372) presentaron las bandas esperadas en la amplificación en PCR convencional y finalmente 7.8% (29/372) resultó positivo para *Leptospira* después de la secuenciación (Figura 3).

Por otro lado, los cebadores CD fueron utilizados para analizar 372 muestras, especificadas en la Sección 6.5. Aproximadamente 68.8% (256/372) de las muestras analizadas presentaron una señal de amplificación para la PCR en tiempo real, 9.4% (35/372) mostraron las bandas esperadas en la amplificación en PCR convencional y finalmente 6.5% (24/372) resultó positivo para *Leptospira* después de la secuenciación (Figura 4).

Debido al elevado porcentaje de muestras que inicialmente presentaron una señal de amplificación para la PCR en tiempo real pero que no obtuvo homología con el género *Leptospira*, se vio la necesidad de evaluar los resultados obtenidos en esta investigación junto con los resultados de la tesis de Chiriboga et al., (2014).

Se observó que todas las muestras que presentaron una señal de amplificación en un Ct menor a 26 ciclos en la PCR en tiempo real con los cebadores C/D fueron confirmadas positivas por su alta homología con especies de *Leptospira* spp. (Figura 4). No se logró detectar un Ct de especificidad utilizando los cebadores AB debido a que se presentan falsos positivos con todos los rangos de Ct.

Adicionalmente se detectó muestras positivas hasta con un Ct de 35 ciclos, sin embargo también se observó falsos positivos en este intervalo. Por encima de los 35 ciclos se encontró una única secuencia con homología al género *Leptospira* utilizando los cebadores A/B. Por otro lado, con los cebadores C/D se encontraron dos secuencias con homología al género *Leptospira* por encima de los 35 ciclos. El análisis permitió identificar que el 82.6% (25/29) de las muestras confirmadas positivas, por su alta homología con especies de *Leptospira*, tuvieron un Ct menor a 35 ciclos en la PCR en tiempo real con los cebadores A/B (Figura 3). Mientras que el 91.3% (21/23) de las muestras confirmadas positivas, por su alta homología con

especies de *Leptospira*, tuvieron un Ct menor a 35 ciclos en la PCR en tiempo real con los cebadores C/D (Figura 4).

8. Discusión

La leptospirosis es una enfermedad de distribución mundial altamente prevalente en zonas con alto rango de temperatura y pluviosidad. La localización de Ecuador en el trópico, especialmente la zona costera y del oriente, provee condiciones ambientales que favorecen la multiplicación y dispersión de las especies del género *Leptospira*. Esto convierte a la leptospirosis en una de las enfermedades más comunes en esta zona (Manock, et al., 2009; Everard & Everard, 1993). En la provincia de Manabí se ha reportado varios brotes de leptospirosis confirmados por el Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación (INSPI) mediante datos serológicos (Pinargote, 2012). Datos oficiales del INSPI-Portoviejo revelan que durante el año 2012 se encontró un incremento alarmante de seropositividad para leptospirosis en la provincia de Manabí en relación a los años 2010 (INSPI-Portoviejo, 2013). Aproximadamente el 50% de los casos del brote del 2012 provienen de los meses de abril a julio concentrados en el cantón Portoviejo (INSPI-Portoviejo, 2013) lo que sugiere que esta localidad es un punto estratégico para investigar dicha enfermedad. El presente estudio piloto, proporciona herramientas para futuros estudios y monitoreo de la leptospirosis en el cantón Portoviejo a través de la detección e identificación de especies de *Leptospira* patógena e intermedia en reservorios animales de la enfermedad, fuentes de agua natural y en el ser humano.

La Leptospirosis ha sido reportada ampliamente en animales de granja, roedores e incluso animales salvajes, gracias a la capacidad de las especies patógenas de *Leptospira* de producir

infección sistémica e incluso colonizar riñones y aparatos reproductivos en ciertos casos (Bunell, 2000). Uno de los resultados más llamativos del presente estudio es la presencia de un alto porcentaje (17.85%) de muestras positivas para la presencia de ADN de *Leptospira* en muestras de orina provenientes de vacas y cerdos muestreados en los camales de Riochico y Calderón. Se identificó tres especies de *Leptospira* en las muestras de bovinos y porcinos: *L. borgpetersenii*, *L. interrogans* (patógenas) y *L. wolffii* (intermedia). Este hallazgo no solo podría indicar un estado de portador crónico de los individuos analizados, sino también el hecho de que son portadores de varias especies de *Leptospira*. Las especies patógenas *L. borgpetersenii* y *L. interrogans* han sido relacionadas a abortos, infertilidad y pérdida en la producción de leche en poblaciones de ganado vacuno (Ellis, et al, 1985; Ellis, et al., 1986; Ellis, et al., 1976; Thiermann, 1982). Por otro lado, *L. wolffii* es considerada como una especie con patogenicidad intermedia. Especies de este grupo de *Leptospira* han sido reportadas previamente en brotes de leptospirosis humana en Tailandia y Perú (Slack, et al., 2008; Ganoza, et al., 2010). Varios estudios reportan alto porcentaje de muestras positivas para *Leptospira* patógena en bovinos, especialmente dentro de criaderos, en donde la leptospirosis produce abortos, infertilidad y pérdida en la producción de leche (Ellis, et al., 1985; Ellis, et al., 1986; Ellis, et al., 1976; Thiermann, 1982). Talpada et al., (2003) se enfocaron en muestras de orina de ganado recolectadas en varios mataderos del estado de Texas (Estados Unidos) donde se encontró 35% de muestras positivas para la presencia de ADN de *Leptospira* spp. Estos resultados sugieren que el ganado vacuno podría ser una fuente potencial de infección para humanos y otras poblaciones de ganado. Con respecto a ganado porcino, Campagnolo et al., (2000) realizaron una investigación epidemiológica en la Universidad de Missouri-Columbia que sugiere que las poblaciones de cerdos infectados con leptospirosis pueden ser

consideradas como factor de riesgo importante para productores de carne y trabajadores de mataderos. Otros animales domésticos que han estado involucrados como fuente de leptospirosis son caninos, como lo sugiere el estudio de Céspedes et al., (2009) donde se analizó una fuente de agua subterránea asociada al contacto con estos animales en Lima-Perú. Lamentablemente, en este estudio no se pudo tomar muestras de perros debido a la dificultad del proceso de colección de la muestra de orina. A pesar de esto, el alto porcentaje de muestras positivas de orina de animales de camal permite sugerir que el ganado porcino y vacuno juega un rol importante como especies portadoras de *Leptospira*. También es necesario tomar en cuenta que la mayoría de los animales muestreados para este estudio viven en zonas cercanas al domicilio de los propietarios. Esto sugiere un alto riesgo de adquirir leptospirosis por parte de los propietarios de los animales.

Las ratas juegan un papel importante en la transmisión de la leptospirosis. Varios estudios implican a este roedor como el principal reservorio de la enfermedad (Vijayachari, 2008; Khairani-Bejo, 2002; Yalin, et al., 2011). La colonización renal es típica de los animales reservorios pues tanto leptospiras patógenas como intermedias tienen la capacidad de colonizar sus túbulos renales (Ganoza, et al., 2010). Existen estudios que sugieren que una de las principales vías para adquirir leptospirosis en humanos podría ser a través de fuentes de agua contaminada con orina de ratas infectadas (Green-Mckenzie & Shoff, 2012). El presente estudio analizó 80 riñones de ratas, 8.8% de las muestras fue positivo para la presencia de ADN de *Leptospira* spp. Dos de las especies encontradas, *L. borgpetersenii* (patógena) y *L. wolffii* (intermedia) fueron también identificadas en muestras de orina de bovinos y porcinos. Adicionalmente dos ratas presentaron *Leptospira noguchii* (patógena). Debido a que el porcentaje de muestras positivas de riñones de rata fue menor (8.8%)

comparado con las muestras de orina de animales de matadero. Se puede sugerir con estos datos que el ganado bovino y porcino juega un papel más importante que las ratas en la transmisión y circulación de la leptospirosis en la localidad muestreada. A pesar de esto, el porcentaje en ratas merece especial atención. En las zonas rurales del cantón Portoviejo, la abundancia de ratas podría estar ligada a la presencia de graneros. Esto constituye un riesgo a la salud pública pues estos roedores se caracterizan por vivir en cercanías a humanos lo cual incrementa la posibilidad de transmisión de la enfermedad (Vijayachari, 2008).

Los problemas del sistema de alcantarillado son comunes en el cantón Portoviejo. Existen zonas que no tienen este servicio básico incrementando el riesgo de exposición a aguas contaminadas con orina de animales infectados (Levett, 2001) y la diseminación de leptospirosis. En este estudio se muestreó agua del río Chico que bordea al cantón Portoviejo. Se encontró una muestra positiva para *L. kirschneri*, otra especie patógena. El bajo porcentaje de muestras positivas de agua de río puede estar relacionada con la limitada concentración de ADN de *Leptospira* spp., en agua. A su vez, esto podría estar directamente relacionado con la supervivencia de la bacteria en el medio (Diesch, 1971). Adicionalmente, no se puede descartar la presencia de agentes que pudo haber inhibido la amplificación del ADN durante la PCR, dando como resultado falsos negativos.

El humano es un hospedador accidental de las bacterias del género *Leptospira* (Levett, 2001). La leptospirosis humana puede adquirirse a través de contacto con fluidos corporales de animales infectados o contacto con agua, suelo, o comida contaminada con orina de animales infectados (Levett, 2001). La bacteria puede entrar al cuerpo a través de la piel o membranas. A continuación se presenta la infección como un cuadro clínico bifásico. En la primera etapa

el paciente presenta bacteremia caracterizada por fiebre, escalofríos, cefalea, mialgia, entre otros. Durante esta etapa (5 a 7 días), las leptospiras circulan por la sangre del paciente. En la segunda etapa se observa bacteriuria junto con la elevación de anticuerpos específicos contra la bacteria provocando los síntomas más severos de la infección como falla renal, falla hepática o meningitis (Utzinger, et al., 2012; Bal, et al., 1994). Solo 1 de las muestras de orina humana de pacientes febriles, colectada durante el presente estudio, resultó positiva utilizando la metodología aplicada. Este resultado llama la atención, debido a que las muestras provinieron de una zona endémica para leptospirosis. Una posible explicación puede ser que muchas de las muestras fueron tomadas antes de la fase de bacteriuria. Es decir, la cantidad de ADN de *Leptospira* en el momento de la toma de muestra de orina era muy baja como para ser detectada con el ensayo utilizado en este estudio. Otra posibilidad es que algunos de estos pacientes pudieron haber ingerido antibióticos antes de la toma de la muestra, eliminando gran parte de bacterias evitando su multiplicación. De esta manera, la concentración de ADN de *Leptospira* será menor en comparación con aquellos pacientes que no han consumido antibióticos. Por otro lado no se encontró ninguna muestra positiva en sueros sanguíneos de pacientes febriles. Investigaciones realizadas en los últimos años, sugieren que la PCR de muestras de suero tiene un porcentaje inferior de sensibilidad en relación con la PCR en muestras de orina. Esto podría estar relacionado a que las muestras de orina pueden ser colectadas fácilmente en grandes cantidades lo cual aumenta el número de leptospiras por muestra (Bal, et al., 1994). Gravekamp et al., (1993) reporta, que a pesar de que el análisis de muestras de suero sanguíneo con PCR es más sensible que el cultivo, 50% de muestras positivas para *Leptospira* no fueron detectadas por este método.

El desarrollo de la PCR ha permitido acelerar el proceso de detección e identificación de microorganismos en muestras clínicas y ambientales. Hoy en día los ensayos de PCR en tiempo real presentan un potencial más rápido y sensible en comparación con las demás técnicas (Corless, et al., 2000; Klein, 2002). La detección de *Leptospira* en muestras clínicas y ambientales ha sido realizada tradicionalmente mediante técnicas de aislamiento de *Leptospira* utilizando medios de cultivo especializados y serología. El desarrollo de técnicas de PCR en tiempo real ha permitido aumentar la sensibilidad de detección de *Leptospira* en sueros sanguíneos, orina, líquido céfalo-raquídeo y tejidos (Bourhy, et al., 2011; Levett, 2005; Ahmed, et al., 2009). En este estudio se utilizó la técnica de PCR en tiempo real, PCR convencional y secuenciación para detectar la presencia de ADN de *Leptospira* en muestras de animales, agua de río y humanos.

Chiriboga et al., (2014) secuenció 24 amplicones de muestras sanguíneas humanas que mostraron una señal de amplificación en la PCR en tiempo real y convencional. Los resultados mostraron que 1 amplicón se identificó como *Leptospira spp.*, 10 amplicones como Uncultured bacterium, 7 amplicones como *Leptospira wolffii*, 2 amplicones como especie indefinida y 4 amplicones mostraron secuencias sucias (Figura 5). Es decir, el 42% de las secuencias se identificaron como “Bacterias No Cultivables” después de la secuenciación. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en esta investigación donde el 49% pertenece a esta clasificación (no *Leptospira*). Los resultados del análisis filogenético molecular con las secuencias amplificadas permitió asegurar que las secuencias de suero humano efectivamente no pertenecen al género *Leptospira*. Estos resultados revelaron la necesidad de determinar el Ct máximo de la PCR en tiempo real antes de considerar a una muestra positiva. La amplificación de ADN de otras bacterias (no *Leptospira*) no solo se presentó en las muestras de sueros

humanos sino también en las demás muestras. Es también importante resaltar que el 71% de los amplicones totales positivos tanto para la PCR en tiempo real como para la reamplificación en PCR convencional no pertenecían al género *Leptospira*. La PCR en tiempo real con cebadores AB/CD amplifica una región del gen ribosomal del 16S RNA (Merien, et al., 1992) en especies del género *Leptospira*. Debido a que esta región es altamente conservada, los cebadores derivados de este gen en *Leptospira* pueden presentar homologías con otros microorganismos dando lugar a falsos positivos por reacción cruzada con otras bacterias (Wagenaar, et al., 1991). Esto podría explicar por qué se identificaron otros microorganismos en las muestras aun cuando se utilizaron cebadores específicos para el género *Leptospira*.

La especificidad de la técnica de PCR en tiempo real depende de la técnica que se utilice para monitorear la reacción de amplificación. Una futura solución al problema de especificidad de la PCR en tiempo real sería la implementación de Sondas Taqman. Esta metodología se basa en la aplicación de la actividad exonucleasa 5'-3' de la ADN polimerasa para separar la sonda Taqman durante el PCR. Adicionalmente la temperatura de fusión de las sondas es mayor a la de los cebadores utilizados normalmente. De esta forma permite aumentar la especificidad de la PCR (Lie y Petropoulos, 1998).

Por otro lado, un aporte importante en este estudio fue el determinar la especificidad de la PCR en tiempo real utilizada por el Laboratorio de Microbiología de la USFQ con los cebadores AB/CD (Merien, et al., 2005). Esto se logró al relacionar el Ct del ensayo con las muestras confirmadas positivas mediante secuenciamiento de ADN. Previo a la realización de este análisis, el Laboratorio de Microbiología enviaba a secuenciar todos los amplicones que daban señal en la PCR en tiempo real y confirmadas en la reamplificación en PCR convencional. Se

determinó que el Ct límite de especificidad para la PCR en tiempo real con cebadores CD es de 26 ciclos. Sin embargo la mayoría de la muestras confirmadas positivas después de la secuenciación (82.6% con A/B y 91.3% con C/D) presentaron Ct menor a 35 ciclos en la PCR en tiempo real (Figura 3 y 4). Estos resultados sugieren que a pesar de que el límite de especificidad detectado fue de 26 ciclos, se debería secuenciar amplicones de la PCR convencional que hayan presentado Ct menor a 35 ciclos en la PCR en tiempo real. Esto con el fin de no descartar muestras positivas. A pesar de que también se encontraron muestras negativas bajo 35 ciclos de Ct, es necesario recordar que este método es uno de los más eficaces en detección de *Leptospira* actualmente. Al secuenciar los amplicones de la PCR convencional con Ct menor a 35 ciclos, se permitirá seguir utilizando esta técnica en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito con una menor detección de falsos positivos lo cual pretende reducir los gastos de secuenciación en la investigación.

El uso de un cebador que no discrimina entre especies patógenas e intermedias, permitió detectar la circulación y coexistencia de varias especies de *Leptospira* que pueden ser excretadas al medio ambiente a través de distintos reservorios, domésticos y no domésticos en la misma localidad (Terpstra, 1992; Reza, et al., 2009). Los resultados obtenidos son interesantes pues se detectaron 6 especies de *Leptospira* que estuvieron circulando en el cantón Portoviejo, de las cuales 5 son patógenas (*L. borgpetersenii*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. kirschneri*, *L. interrogans*) y 1 es intermedia (*L. wolffii*). El hecho de que coexistan varias especies de *Leptospira* representa un enigma biológico.

El cantón Portoviejo reúne todas las condiciones necesarias para facilitar la transmisión y diseminación de la bacteria. Por este motivo el muestreo de los principales reservorios involucrados en la transmisión de la leptospirosis es un aporte importante a tomar en cuenta para la prevención de dicha enfermedad. Los resultados obtenidos en este estudio permitieron al Laboratorio de Microbiología de la USFQ obtener la experiencia necesaria para expandir el proyecto a otros cantones de la provincia de Manabí bajo el financiamiento del INH Institute of National Health (USA).

9. Conclusiones

- El estudio piloto para detectar especies del género *Leptospira* en el cantón Portoviejo, llevado a cabo durante los meses abril, mayo y junio del 2013, permitió muestrear a animales reservorios, fuentes de agua natural y ser humano.
- La metodología utilizada, tanto para el muestreo como para la extracción de ADN y detección de especies del género *Leptospira* mediante PCR y secuenciamiento, permitió detectar la presencia del patógeno en las muestras analizadas.
- El hallazgo de 6 diferentes especies del género *Leptospira* (*L. borgpetersenii*, *L. wolffii*, *L. santarosai*, *L. kirschneri*, *L. noguchii* y *L. interrogans*) en las muestras analizadas, demuestra la circulación de múltiples especies del patógeno en el cantón Portoviejo. De las especies encontradas, cinco son patógenas y una está clasificada dentro de las especies que poseen patogenicidad intermedia o indeterminada (*L. wolffii*).
- No se detectó la presencia de especies de *Leptospira* en muestras de sueros humanos. Esto no necesariamente indica ausencia de ADN de *Leptospira* en dichas muestras, ya

que pudo haber sido causado por una concentración de ADN por debajo del umbral de detección de la PCR utilizado.

- El alto porcentaje de muestras de orina de animales de matadero positivas (17.8%), sugiere que estos animales son importantes portadores y dispersores de leptospirosis dentro de la localidad en estudio.
- Debido a que el porcentaje de muestras positivas en ratas es menor (8.8%) a la encontrada en suinos y bovinos, se sugiere - que en esta localidad - los suinos y bovinos juegan un papel más importante que las ratas en la transmisión de la leptospirosis.
- El bajo porcentaje de muestras positivas de agua de río y sueros humanos, no permitió relacionar las especies de *Leptospira* encontradas en las diferentes muestras (ambiente, animales, humanos).
- Se identificó la especificidad relacionado con el Ct (Cycle Time) de la PCR en tiempo real con los cebadores AB/CD. El análisis realizado sugiere que se debería secuenciar las muestras con Ct menor a 35 ciclos que hayan presentado la banda correspondiente en la PCR convencional para reducir recursos en la investigación.

10. Recomendaciones

El desarrollo de nuevas técnicas con mayor especificidad es indispensable para futuros estudios en este campo. Sin embargo por el momento, se recomienda la aplicación de tecnología de Sondas Taqman con el fin de reducir el porcentaje de falsos positivos en el análisis de las muestras.

Se recomienda incrementar el número de muestras a analizar para dar mayor robustez a la investigación especialmente en lo referente a las muestras de agua de río.

Es necesario incrementar el tiempo de muestreo en futuras investigaciones. Es decir, muestrear los reservorios y medio ambiente no solo en época lluviosa sino durante un periodo mayor de tiempo. De esta manera se pretende determinar la dinámica de las infecciones de leptospirosis.

Debido al alto porcentaje de muestras de orina de animales de camal positivas se recomienda el control de las infecciones causadas por *Leptospira* en vacas y cerdos de las localidades estudiadas pues los resultados sugieren que juegan un papel importante en la transmisión y circulación de la leptospirosis.

El porcentaje de muestras de riñones de rata positivos indican la necesidad de controlar las poblaciones de roedores y drenaje de aguas durante la estación lluviosa puesto que estos factores potencializan el riesgo de adquirir leptospirosis.

Los resultados sugieren que a pesar de que el límite de especificidad detectado en este análisis es bajo un Ct de 26 ciclos al utilizar los cebadores C/D, se debería secuenciar amplicones de la PCR convencional que hayan presentado Ct menor a 35 ciclos en la PCR en tiempo real, para no descartar posibles muestras positivas.

11. Bibliografía

- Ahmed, A., Engelberts, M. F., Boer, K. R., Ahmed, N., & Hartskeerl, R. A. (2009). Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. *PLoS ONE*, *4*, e7093.
- Araujo, P. (2008). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *J Chromatogr. B*, *877*, 2224-2234.
- Bal, A., Gravenkamp, C., Hartskeerl, R., de Meza-Brewster, J., Korver, H., & Terpstra, W. (1994). Detection of *Leptospira* in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *J Clin Micro*, *32*, 1894-1898.
- Baquero, M. I., López, N., Mejía, M. E., & Trueba, G. (2010). Evaluation of a polymerase chain reaction for the diagnosis of Leptospirosis in cattle. *The Open Veterinary Science Journal*, *4*, 31-35.
- Bermeo, E. (2012). *Detección de circovirus porcino tipo 2 en cerdos del Ecuador mediante PCR*. COCSA. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- Bharti, A. R., Nally, J. E., & Ricardi, J. N. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infectious Diseases*, *3*(12), 757-771.
- Bourhy, P., Bremont, S., Zinini, F., Giry, C., & Picardeau, M. (June de 2011). Comparison of Real Time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, *9*(6), 2154-2160.
- Bulach, D. M. (2006). Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, *103*, 14560-14565.
- Bunell, J. H. (2000). Detection of pathogenic *leptospira* spp. infections among mammals captured in the Peruvian amazonbasin region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, *63*, 225-228.
- Campagnolo, E., Warwick, M., Marx, H., Cowart, R., Donnell, D., Bajani, M., . . . Ashford, D. (2000). Analysis of the 1998 outbreak of leptospirosis in Missouri in humans exposed to infected swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association.*, *216*(5), 676-682.
- Céspedes, M., Tapia, R., Balda, L., Gonzalez, D., Glenney, M., & Vinetz, J. (2009). Brote de leptospirosis asociado a la natación en una fuente de agua subterránea en una zona costera Lima-Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, *26*(4), 441-448.

- Chiriboga, J. I., & Trueba, G. A. (2014). *Detección de especies de Leptospira en suero sanguíneo*. Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- Corless, C. E., Guiver, M., Borrow, R., Edwards-Jones, V., Kaczmarski, E. B., & Fox, A. J. (2000). Contamination and sensibility issues with a real time universal 16S rRNA PCR. *J Clin. Microbiol.*, 38(5), 1747-1752.
- Diesch, S. (1971). Survival of leptospire in cattle manure. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 159, 1513-1517.
- Ellis, W., O'Brien, J., Bryson, D., & Mackie, D. (1985). Bovine leptospirosis: some clinical features of serovar hardjo infection. *Vet. Rec.*, 117, 101-104.
- Ellis, W., O'Brien, J., Neill, S., Hanna, J., & Bryson, D. (1976). The isolation of leptospire from an aborted bovine fetus. *Vet. Rec.*, 99, 458-459.
- Ellis, W., O'Brien, J., Neill, S., Hanna, J., & Bryson, D. (1986). Bovine leptospirosis: Experimental serovar hardjo infection. *Vet. Microbiol.*, 11, 293-299.
- Everard, J., & Everard, C. O. (1993). Leptospirosis in the Caribbean. *Rev. Med. Microbiol.*, 4, 114-122.
- Faber, N. A., Crawford, M., LeFebvre, R. B., Buyukmihci, N. C., Madigan, J. E., & Willits, N. H. (2000). Detection of *Leptospira* spp. in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis. *J. Clin Microbiol*, 38(7), 2731-2733.
- Faine, S. (1982). Guidelines for the Control and Prevention of Leptospirosis. WHO, (pág. 67). Geneva.
- Faine, S. (1994). *Leptospira and leptospirosis*. London: CRC Press.
- Faine, S., Adler, B., Bolin, C., & Perolat, P. (1999). *Leptospira and Leptospirosis* (2nd Edition ed.). Melbourne.
- Ganoza, C., Matthias, M., Saito, M., Cespedes, M., Gotuzzo, E., & Vinetz, J. (2010). Asymptomatic Renal Colonization of humans in the Peruvian Amazon by *Leptospira*. *Plos Negl Trop Dis*. doi:10.1371/journal.pntd.0000612
- Grace, D., Mutua, F., Ochungo, P., Kruska, R., Jones, K., Brierley, L., . . . Ogotu, F. (2012). *Mapping of poverty and likely zoonoses hotspots*. Report to Department for International Development, ILRI.

- Gravekamp, C., van de Kemp, H., Franzen, M., Carrington, D., Schoone, G., van Eys, G., . . . Terpstra, W. (1993). Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J. Gen. Microbiol*, *193*, 1691-1700.
- Green-Mckenzie, J., & Shoff, W. H. (2012). *Leptospirosis in emergency medicine*. Obtenido de E Medicine: <http://emedicine.medscape.com/article/788751-overview>.
- Gutierrez, B., Barragán, V. (2013). *Estandarización de un protocolo de recolección de muestras y PCR en tiempo real para la detección e identificación de especies de leptospira patógenas en muestras de agua de río*. Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- Helmerhorst, H. J., van Tol, E. N., Tuinman, P. R., de Vries, P. J., Hartskeerl, R. A., Grobusch, M. P., & Hovius, J. W. (2012). Severe pulmonary manifestation of Leptospirosis. *Neth J Med.*, *70*, 215-221.
- INAMHI. (2013). *Instituto Nacional de Metereología e Hidrología* . Obtenido de <http://www.serviciometeorologico.gob.ec/>
- INSPI-Portoviejo. (2013). *Leptospirosis en la provincia de Manabí: Análisis de distribución geográfica en meses de alta prevalencia (Mayo-Junio), AÑO 2012*. Quito.
- Johnson , R., & Faine, S. (1984). Leptospira. En N. Krieg, & J. Holt, *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Vol. 1, págs. 62-67). Baltimore: Williams & Wilkins.
- Khairani-Bejo, S. (2002). *Detection of leptospiral infection in wild rats at various localities in West Malaysia*. Serdang, Selagor, Malaysia: University Putra Malaysia.
- Klein, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in molecular medecine*, *8*(6), 257-260.
- Ko, A., Goarant, C., & Picardeau, M. (2009). Leptospira: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature*, 736-747.
- Lau, C. L., Smythe, L. D., Craig, S. B., & Weinstein, P. (2010). Climate change, flooding, urbanization and leptospirosis: Fuelling the fire? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *104*, 631-638.
- Levett, P. (2001). Leptospirosis. *Clin Micro Rev*, *14*, 296-326.
- Levett, P. (2005). Leptospirosis. En G. Mandell, J. Bennett, & R. Dolin, *Principles and Practice of Infectious Diseases* (págs. 2789-2794).

- Levett, P., Morey, R., Galloway, R., Turner, D., Steigerwalt, A., & Mayer, L. (2005). Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *Journal of Medical Microbiology*, 54, 45-49.
- Li, C., Motaleb, M. A., Sal, M., Goldstein, S. F., & Charon, N. (2000). Gyration, rotation, periplasmic flagella: The biology of spirochete motility. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2, 345-354.
- Lie, Y., Petropoulos, C. (1998). Advances in quantitative PCR technology: 5'nuclease assays. *Current Opinion Biotechnol.* 9, 43-48.
- Manock, S. R., Jacobsen, K. H., de Bravo, N. B., Russell, K. L., Negrete, M., Olson, J. G., . . . Kochel, T. (2009). Etiology of acute undifferentiated febrile illness in the Amazon basin of Ecuador. *Am J Trop Med Hyg*, 81(1), 146-151.
- McBride, A., Athanazio, D., Reis, M., & Ko, A. (2005). Leptospirosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 18, 376-386.
- McCarthy, J. J., Canziani, O. F., Leary, N. A., Dokken, D. J., & White, K. S. (2001). *Climate change 2001: impacts, adaptations, and vulnerability*. New York: Cambridge University Press.
- Merien, F., Amouriaux, P., Perolat, P., Baranton, G., & Saint Girons, I. (1992). Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(9), 2219-2224.
- Merien, F., Baraton, G., & Perolat, P. (1995). Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of Leptospirosis. *J Infect Dis*, 32, 281-285.
- Merien, F., Portnoi, D., Bourhy, P., Charavay, F., Berlioz-Arthaud, A., & Baraton, G. (2005). A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiology Letter*, 249, 139-147.
- Murray, M. G., & Thompson, W. T. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19), 4321-4326.
- Nascimento, A. (2004). Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J. Bacteriol.*, 186, 2164-2172.
- Noguchi, H. (1919). Etiology of yellow fever: I. Symptomatology and pathological findings of the yellow fever prevalent in Guayaquil. *J. Exp. Med.*, 29(6), 547-564.

- OPS; CEPIS. (2003). Impacto del fenómeno del niño en la infraestructura de agua y alcantarillado: La experiencia del Ecuador en 1997-1998. *Serie Salud Ambiental y Desastres*, 3, 81.
- Organización Mundial de la Salud. (2008). *Leptospirosis Humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control*. Rio de Janeiro.
- Pappas, G., Papadimitriou, P., Siozopoulou, V., Christou, L., & Akritidis, N. (2008). The globalization of leptospirosis: Worldwide incidence trends. *International Journal of Infectious Disease*, 12, 351-357.
- Paster, B. J., Dewhirst, F. E., Weisburg, W. G., Tordoff, L. A., Fraser, G. J., Hespell, R. B., . . . Woese, C. R. (1991). Phylogenetic analysis of the spirochetes. *J. Bacteriol.*, 173, 6101-6109.
- Picardeau, M. (2008). Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS ONE* 3.
- Picardeau, M., & Brenot, A. (2001). First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa* *flaB* results in non-motile mutant deficient in endoflagella. *Mol. Microbiol*, 40, 189-199.
- Pinargote, C. (7 de Junio de 2012). Confirman 345 casos de leptospirosis en Manabí. (E. Diario, Entrevistador)
- Plank, R., & Deborah, D. (2000). Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes and Infection*, 2, 1265-1276.
- Qiu, X., Wu, L., Huang, H., McDonel, P. E., Palumbo, A. V., Tiedje, J. M., & Zhou, J. (Feb de 2001). Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Applied and Environmental Microbiology*, 880-887. doi:10.1128/AEM.67.2.880-887.2001
- Ren, S. (2003). Unique and physiological pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole genome sequencing. *Nature*, 422, 888-893.
- Reza, H., Mansour, F., Heisarzahed, A., & Asmar, M. (2009). Isolation and serotyping of endemic leptospire of eastern part of flat area of Guilan province, Iran. *J. Gordan Uni Med Sci.*, 11(3), 53-59.
- Rusbridge, S., Caldow, G., Crawshaw, M., & Gunn, G. (2004). *Leptospira hardjo* infection in cattle. Edinburgh: SAC.

- Saito, M. V. (2012). *Leptospira idonei* sp. nov., isolated from environmental water in Fukuoka, Japan. *Int J of Syst and Evo Microb.*
- Scialfa, E., Bolpe, J., Bardón, J. C., Ridaó, G., Gentile, J., & Gallicchio, O. (2010). Isolation of *Leptospira interrogans* from suburban rats in Tandil. *Revista Argentina de Microbiología*, 42, 126-128.
- Sheldon, W. (1953). Leptospiral antigen demonstrated by the fluorescent antibody technique in human muscle lesions of *Leptospira interrogans* serogroup icterohaemorrhagiae. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 84, 165-167.
- Slack, A., Kalambaheti, T., Symonds, M., Dohnt, M., Galloway, R., Steigerwalt, A., . . . Smythe, L. (2008). *Leptospira wolffii* sp. Nov., isolated from a human with suspect leptospirosis in Thailand. *Int. J. Sys. Evo. Microbiol.*, 58, 2305-2308.
- Smith, I., Halpin, K., Warrillow, D., & Smith, G. (2001). Development of a fluorogenic RT-PCR assay (Taqman) for the detection of Hendra virus. *J Virol Methods*, 98, 33-40.
- Swain, R. (1957). The electron-microscopical anatomy of *Leptospira canicola*. *J. Patrol. Bacteriol*, 73, 155-158.
- Talpada, M., Garvey, N., Sprowls, R., Eugster, K., & Vinetz, J. (2003). Prevalence of leptospiral infection in Texas cattle: implications for transmission to humans. *Vector-Borne Zoonotic Dis*, 3(3), 141-147.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA:5 Molecular Evolutionary Genetics Analysis Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.
- Terpstra, W. J. (1992). *Leptospirosis on the African continent*. Zimbabwe: Proceeding of a CEC-STD 3. Research Meeting.
- Terpstra, W., Jabboury-Postema, J., & Kerver, H. (1983). Immunoperoxidase staining of leptospire in blood and urine. *Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiologie. Hygiene*, 254, 534-539.
- Terpstra, W., Schoone, G., & ter Schegget, M. (1986). Detection of leptospira DNA by nucleic acid hybridization with P32 and biotin-labelled probes. *J. Med*, 22, 23-28.
- Thiermann, A. (1982). Experimental leptospiral infections in pregnant cattle with organism of the Hebdomatis serogroup. *Am. J. Vet. Res.*, 43, 780-784.
- Thiermann, A. B. (1981). The norway rat as a selective chronic carrier of *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *Journal of Wildlife Diseases*, 17(1), 39-43.

- Tilahun, Z., Reta, D., & Simenew, K. (2013). Global Epidemiological overview of Leptospirosis. *International Journal of Microbiological Research*, 4, 9-15.
- Trueba, G. A., Bolin, C. A., & Zuerner, R. L. (1992). Characterization of the periplasmic flagellum proteins of *Leptospira interrogans*. *J. Bacteriol.*, 174, 4761-4768.
- Tucunduva de Faria, M., Athanazio, D. A., Goncalves, E. A., Silva, E. F., Reis, M. G., & Ko, A. I. (2007). Morphological Alterations in the kidney of rats with natural and experimental *Leptospira* infection. *J. Comp. Path.*, 137, 231-238.
- Utzinger, J., Becker, S. L., Knopp, S., Blum, J., Neumayr, A. L., Keiser, J., & Hatz, C. F. (2012). Neglected tropical diseases: diagnosis, clinical management, treatment and control. *Swiss Med Wkly*.
- Vijayachari, P. S. (2008). Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J. Biosci.*, 557-569.
- Wagenaar, J., Gaastra, W., Segers, R., & van der Zeist, B. (1991). The detection of pathogenic leptospires by amplification of 16S rRNA sequences. En Y. Kobayashi, *Leptospirosis* (pág. 165). Tokyo: University of Tokyo Press.
- World Health Organization. (2000). India: Report of the investigation of a Post-cyclone outbreak in Orissa. *Weekly Epidemiological Report*, 75, 217-223.
- World Health Organization. (2011). *Report of the second meeting of the leptospirosis burden epidemiology reference group*. Geneva: WHO Document Production Services.
- Wuthiekanun, V., Chierakul, W., Limmathurotsakul, D., Smythe, L., Symonds, M., Dohnt, M., . . . Peacock, S. (2007). Optimization of Culture of *Leptospira* from Humans with Leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.*, 45, 1363-1365.
- Yalin, W., Lingbing, Z., Hongliang, Y., Jianmin, X., Xiangyan, Z., Xiaokui, G., . . . Jinhong, Q. (2011). High prevalence of pathogenic *Leptospira* in wild and domesticated animals in an endemic area of China. *AsianPac J Trop Med*, 4(11), 841-845.

12. Tablas

Tabla 1. Especies del género *Leptospira* identificadas en las muestras analizadas. Las muestras que se analizaron corresponden a humanos (suero de pacientes febriles INSPI), animales (orina de vaca/cerdo, y riñón de ratas) y agua del Río Chico (Portoviejo).

	Resultado	# muestras	Especie de <i>Leptospira</i> identificada
Suero pacientes febriles	Negativos	154	
	Positivos	0	
Total		154	
Orina de cerdo	Negativos	27	
	Positivos	2	<i>L. borgpetersenii</i>
		1	<i>L. wolffii</i>
Orina de vaca	Negativos	19	
	Positivos	1	<i>L. wolffii</i>
		5	<i>L. borgpetersenii</i>
Total		56	
Orina Humana	Negativos	4	
	Positivos	1	<i>L. santarosai</i>
Total		5	
Riñones de Rata	Negativos	73	
	Positivos	1	<i>L. wolffii</i>
		4	<i>L. borgpetersenii</i>
Total		80	
Muestras de agua	Negativos	3	
	Positivos	1	<i>L. kirschneri</i>
Total		4	

NOTA: Las muestras de este estudio fueron recolectadas durante los meses Abril, Mayo y Junio los cuales corresponden a la estación lluviosa del año 2013.

Tabla 2. Muestras positivas para la presencia de ADN de *Leptospira*, especie identificada en cada muestra y su correspondiente porcentaje de homología con secuencias del GenBank correspondientes al género *Leptospira*.

Número	Código de muestra	ESPECIE IDENTIFICADA	Porcentaje de homología %
1	29CD	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	100
2	62AB	<i>Leptospira wolffii</i>	100
		<i>Leptospira licerasiae</i>	97
3	8AB	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	100
4	12AB	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	100
5	13AB	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	97
6	15AB	<i>Leptospira wolffii</i>	95
		<i>Leptospira licerasiae</i>	92
7	23AB	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	100
8	30AB	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	50
9	49AB	<i>Leptospira kirschneri</i>	99
		<i>Leptospira interrogans</i>	99
10	53AB	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	100
11	82CD	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	100
12	83AB	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	100
13	84AB	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	99
14	85AB	<i>Leptospira wolffii</i>	100
		<i>Leptospira licerasiae</i>	97
15	91AB	<i>Leptospira noguchii</i>	100
		<i>Leptospira kirschneri</i>	100
16	92AB	<i>Leptospira noguchii</i>	100
		<i>Leptospira kirschneri</i>	100
17	H01	<i>Leptospira santarosai</i>	100
18	R02	<i>Leptospira kirschneri</i>	11
19	75R	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	100

13. Figuras

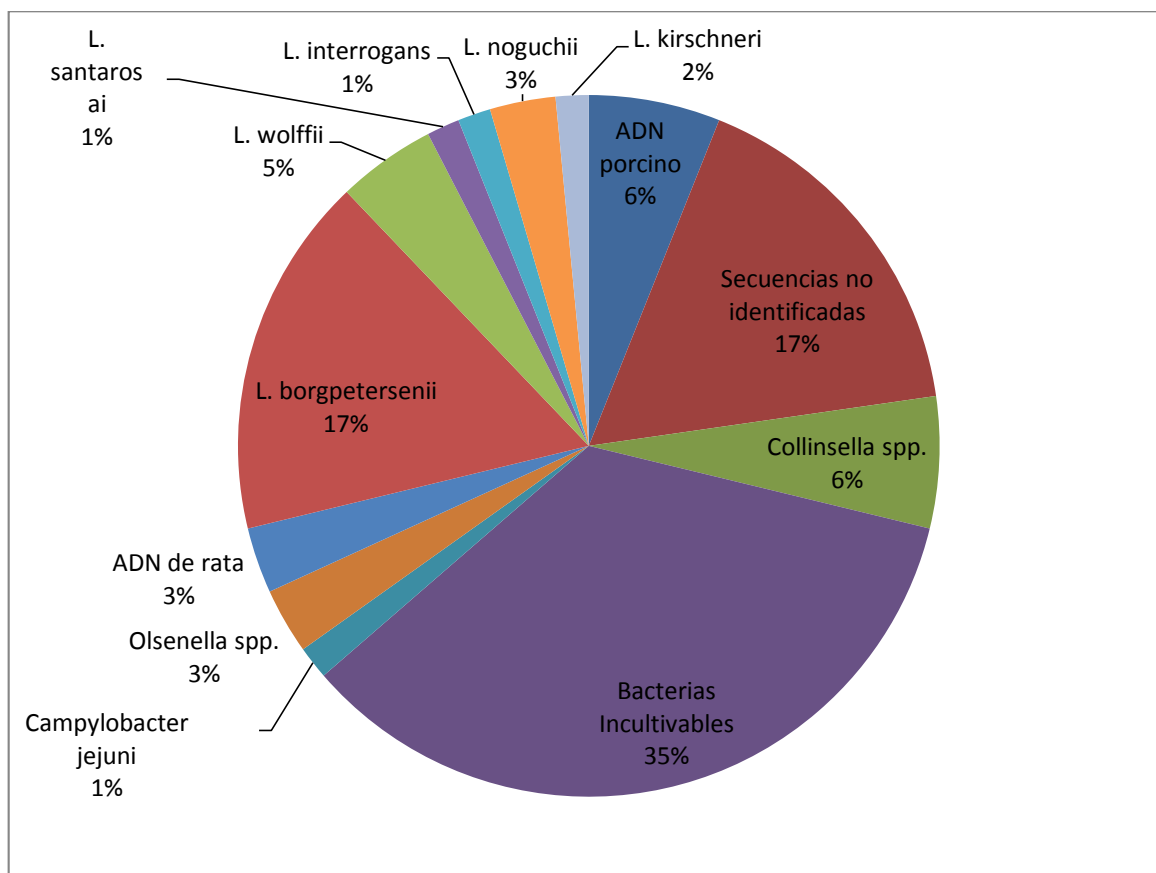


Figura 1. Porcentaje de grupos bacterianos identificados a partir de la secuencia de ADN amplificada en muestras recolectadas durante el presente estudio (PCR convencional con los cebadores AB/CD).

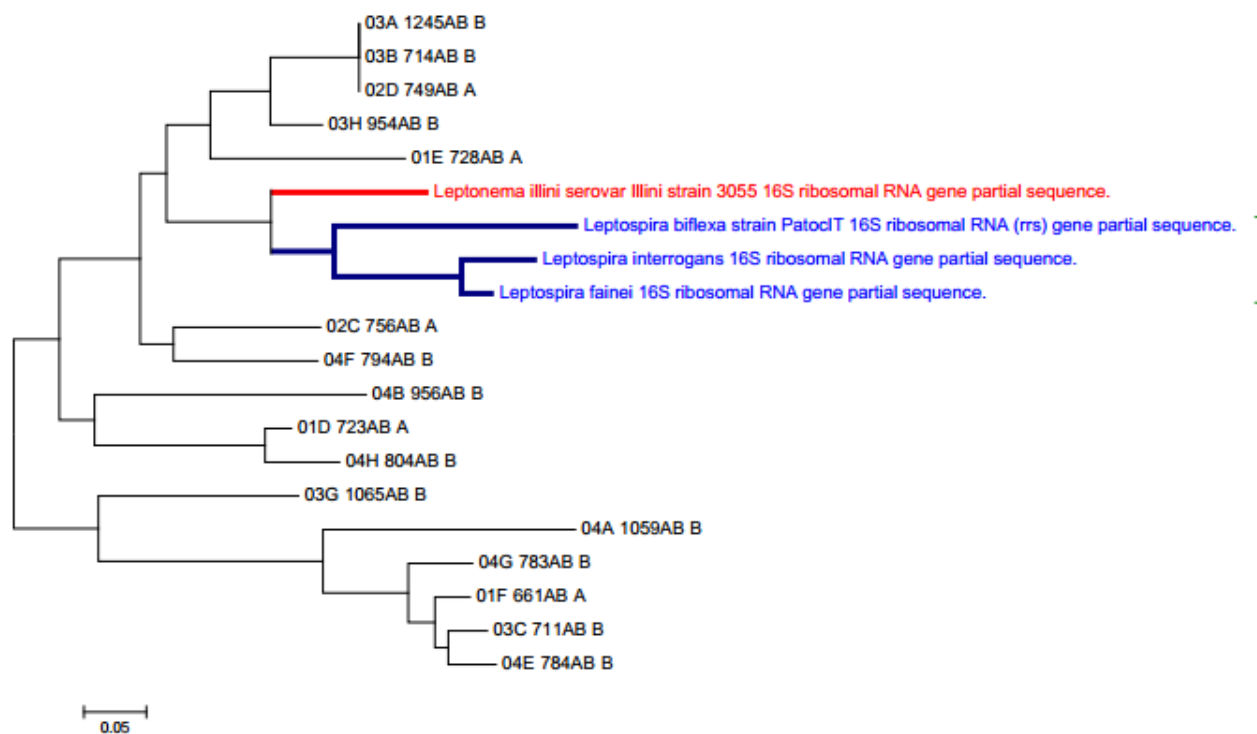


Figura 2.Árbol filogenético, analizado por Máxima Parsimonia con secuencias que presentaron una señal de amplificación en la PCR convencional pero no identificadas como parte del clado Leptospiraceae (*Leptonema illini* y *Leptospira* spp.).

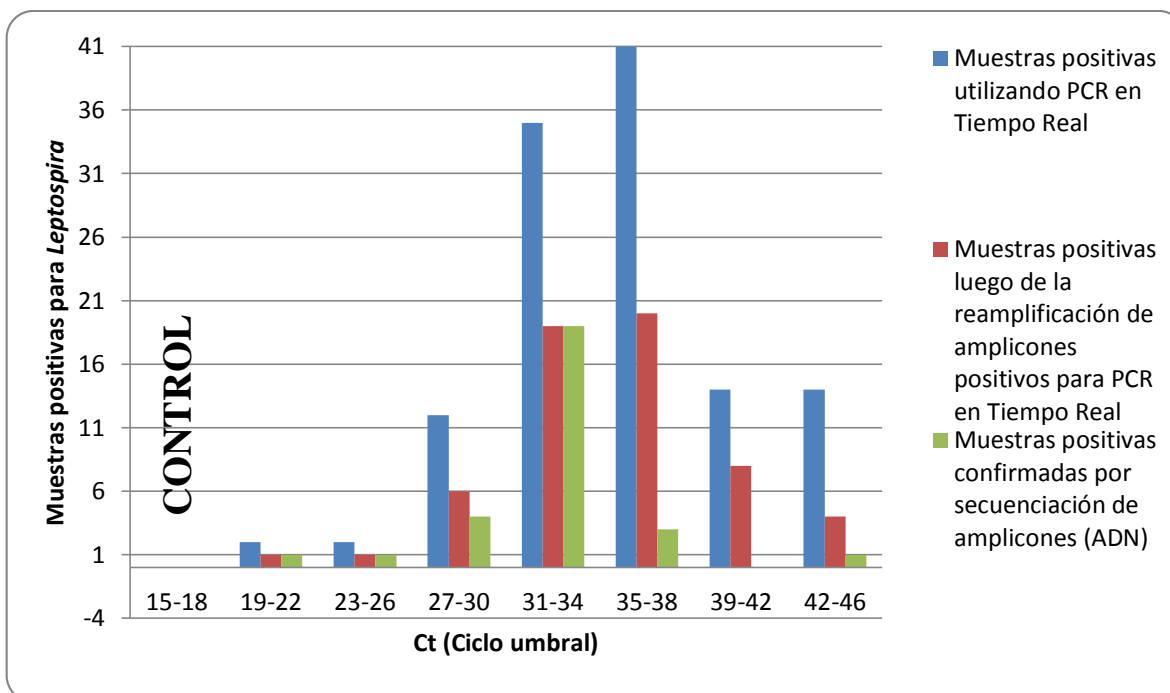


Figura 3. Análisis del Ct (Ciclo umbral) de las muestras positivas para PCR en tiempo real con cebadores AB.

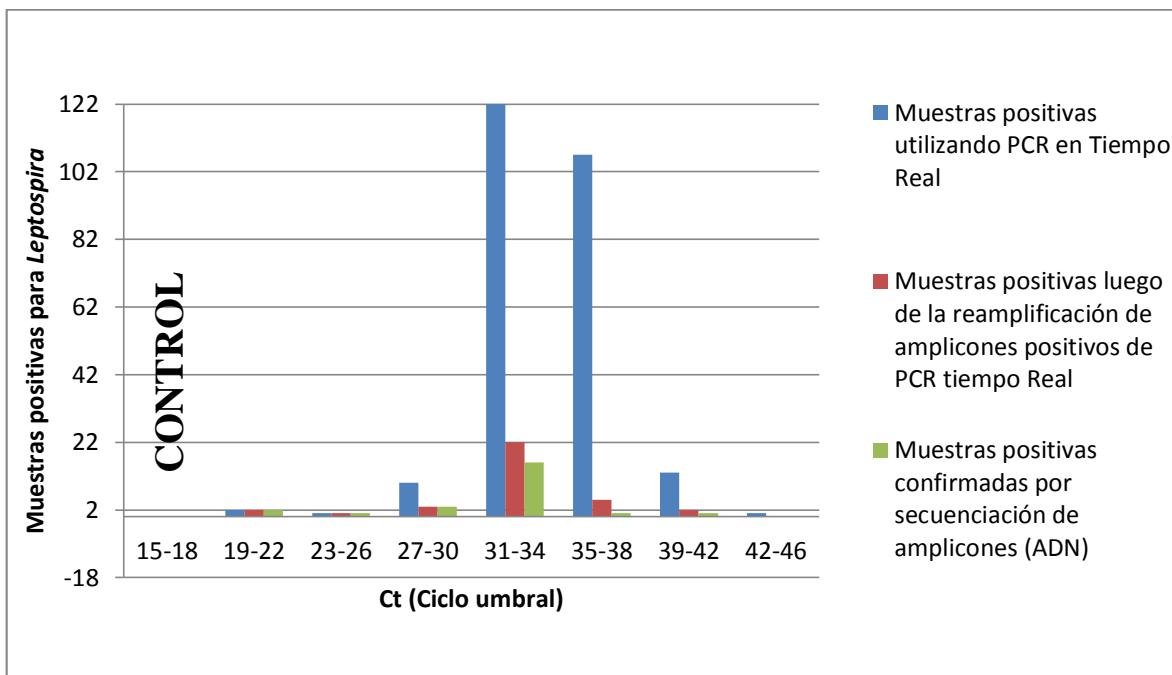


Figura 4. Análisis del Ct (Ciclo umbral) de las muestras positivas para PCR en tiempo real con cebadores CD.

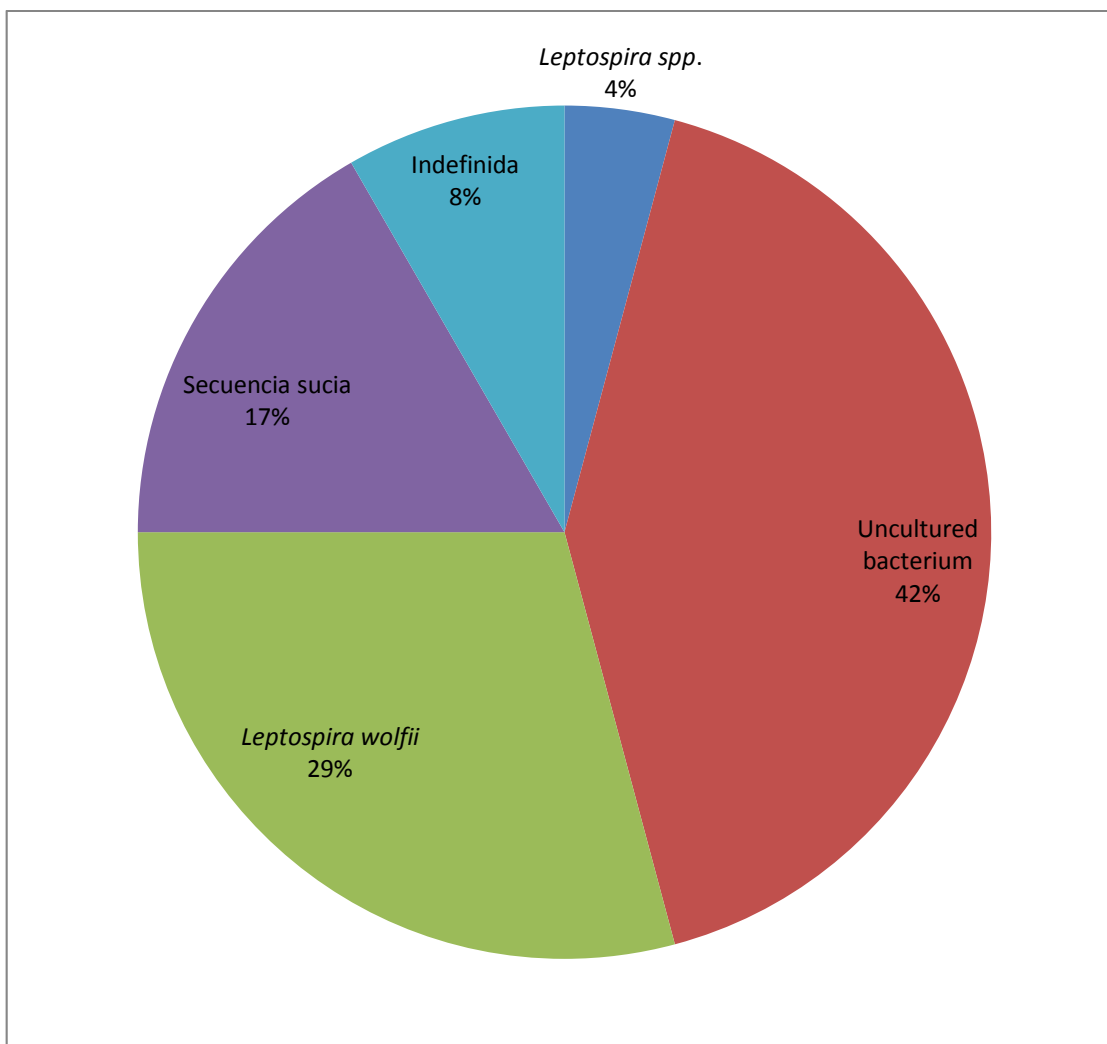


Figura 5. Porcentaje de grupos bacterianos identificados a partir de la secuencia de ADN amplificada a partir de las muestras recolectadas para el trabajo de disertación de Jorge Chiriboga (2014) (PCR en tiempo real con los cebadores AB/CD).

14. Anexos

Anexo 1. Secuencias de cebadores utilizados en la detección de especies de *Leptospira*.

GEN	NOMBRE	SECUENCIAS	AMPLICÓN	REFERENCIA
rrs (16S)	A	5'- GGCGGCGCGTCTITAAACATG- 3'	330pb	(Merien, et al., 2005)
	B	5'- TTCCCCCATTGAGCAAGATT- 3'		
rrs (16S)	C	5'- CAAGTCAAGCGGAGTAGCAA- 3'	289pb	(Merien, et al., 2005)
	D	5'- CTTAACCTGCTGCCTCCCGTA- 3'		
secY	secYIVF	5'- GCGATTCAGTTTAATCCTGC-3'	202pb	(Ahmed, et al., 2009)
	secYIV	5'-GAGTTAGAGCTCAAATCTA- 3'		

Anexo 2. Mezcla de AB/CD utilizando EvaGreen para PCR en Tiempo Real.

REACTIVO	CONC. FINAL	VOL. 1 REAC	VOL. MASTERMIX
Ssofast™ Evagreen® Supermix	1 X	5 µl	10 µl
Cebador F: A/C	0,5 µM	0,5 µl	1 µl
Cebador R: B/D	0,5 µM	0,5 µl	1 µl
H₂O grado PCR		3 µl	6 µl
Volumen Total Mezcla		9 µl	18 µl
ADN		1 µl / rxn	

Concentraciones adecuadas de los reactivos para 2 reacciones con un volumen de reacción total de 10uL empleando 1uL de ADN extraído de suero humano. El ADN no fue medido su concentración ni calidad, para evitar cualquier manipulación antes de la amplificación.

Anexo 3. Mezcla de reamplificación AB/ CD utilizando GoTaq en PCR convencional.

REACTIVO	CONC. INICIAL	CONC. FINAL	VOL. 1 REAC	VOL. MASTERMIX
PCR Buffer	5 X	1 X	5 μ l	20 μ l
Mgcl2	25 Mm	2 Mm	1,6 μ l	8 μ l
DNTPs	1 mM	0,2 mM	4 μ l	20 μ l
Go Flexi® Taq Promega™	5 U/ μ l	0,02 U/ μ l	0,08 μ l	0,4 μ l
Cebador F: A/C	10 μ M	1 μ M	2 μ l	10 μ l
Cebador R: B/C	10 μ M	1 μ M	2 μ l	10 μ l
H₂O grado PCR			4,82 μ l	24,1 μ l
Volumen Total Mezcla			18,5 μ l	92,5 μ l
Amplicón AB/CD			1,5 μ L/RXN	

Concentraciones de los reactivos para la reamplificación de 5 reacciones a un volumen de reacción total de 20uL, empleando 1,5uL de Amplicón obtenido de PCR en Tiempo Real. El ADN no fue medido su concentración ni calidad, para evitar cualquier manipulación antes de la amplificación.