

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Detección de *Leptospira* patógena en muestras de suelos de 6 hogares
de la zona rural del cantón Rocafuerte en la provincia de Manabí**

Corina Stephanie Concha Santos

Ingeniería en Biotecnología

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

Quito, 14 mayo de 2021

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Detección de *Leptospira* patógena en muestras de suelos de 6 hogares de la zona rural del cantón Rocafuerte en la provincia de Manabí

Corina Stephanie Concha Santos

Nombre del profesor, Título académico

Verónica Barragán, PhD

Quito, 14 de mayo de 2021

© DERECHOS DE AUTOR

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

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

Nombres y apellidos: Corina Stephanie Concha Santos

Código: 00136793

Cédula de identidad: 1723116941

Lugar y fecha: Quito, 14 de mayo de 2021

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

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

UNPUBLISHED DOCUMENT

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

RESUMEN

En zonas rurales, es muy común la crianza de animales en el traspatio de las viviendas. Esto sumado al almacenamiento de granos en estas áreas, crea condiciones idóneas que atraen roedores al peridomicilio de las casas. Dicha convivencia entre animales y humanos está muy relacionada con la transmisión de enfermedades zoonóticas como la leptospirosis. Ésta es una enfermedad producida por una bacteria del género *Leptospira*, de la que se han identificado 37 especies pertenecientes al grupo patogénico. La bacteria se excreta en la orina de los animales y el contacto con este fluido o con suelo contaminado incrementa la probabilidad de que las personas que habitan en estas zonas se enfermen de leptospirosis. El objetivo del presente estudio es detectar *Leptospira* patogénica en suelos del peridomicilio de casas ubicadas en zonas rurales de Manabí, que en estudios previos mostraron tener alta positividad de este patógeno en animales. Para esto se tomaron muestras de suelos del cantón Rocafuerte de 6 viviendas diferentes, y se registraron datos sobre las condiciones socioeconómicas observadas. Se realizaron mediciones de pH y humedad, extracción de ADN y amplificación del gen *lipL32* para la detección de *Leptospira* patogénica. Se detectó la presencia de ADN de *Leptospira* en suelos, lo cual representó 4% de muestras positivas y 96% negativas. Asimismo, se observó que ciertas condiciones socioeconómicas como el poseer patio de tierra o la presencia de animales de traspatio pueden ayudar a la transmisión de la bacteria. El alto contenido de humedad en los suelos podría contribuir a la supervivencia de *Leptospira* en el medio ambiente.

Palabras Clave: *Leptospira*, suelos, pH, humedad, condiciones socioeconómicas, zonas rurales.

ABSTRACT

In rural areas, it is very common to raise animals in the backyard of the houses. This, added to the storage of grains in these areas, creates ideal conditions that attract rodents to the peridomiciliary area of the houses. This coexistence between animals and humans is closely related to the transmission of zoonotic diseases such as leptospirosis. This is a disease produced by a bacterium of the genus *Leptospira*, of which 37 species belonging to the pathogenic group have been identified. The bacteria are excreted in the urine of animals and the contact with this fluid or with contaminated soil increases the probability that people living in these areas will become ill with leptospirosis. The objective of the present study is to detect pathogenic *Leptospira* in soils in the peridomiciliary area of houses located in the rural zone of Manabí, which in previous studies have high positivity for this pathogen in animals. For this, soil samples from the Rocafuerte canton were taken from 6 different dwellings, and data on the observed socioeconomic conditions were recorded. PH and humidity measurements, DNA extraction and amplification of the *lipL32* gene were carried out for the detection of pathogenic *Leptospira*. The presence of *Leptospira* DNA was detected in soils, which represented 4% of positive and 96% negative samples. Likewise, it has been realized that certain socioeconomic conditions such as having a dirt yard or the presence of backyard animals can help to the transmission of the bacteria. The high moisture content in soils could contribute to the survival of *Leptospira* in the environment.

Key Words: *Leptospira*, soils, pH, humidity, socioeconomic conditions, rural areas.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	10
MÉTODOS	14
Toma de muestras.....	14
Medición de pH de los suelos	15
Medición de humedad de suelos	15
Extracción de ADN y detección de <i>Leptospira</i> patogénica de suelos.....	16
RESULTADOS.....	17
Detección de <i>Leptospira</i> patógena en muestras de suelo.....	17
Observaciones sobre las condiciones socioeconómicas.....	17
Mediciones de pH y humedad.....	18
DISCUSIÓN	19
Análisis de las condiciones socioeconómicas	19
Análisis del pH y humedad	21
CONCLUSIONES	22
TABLAS.....	23
FIGURAS	24
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Resultados de la amplificación del gen liL32 en muestras de suelo.....23

Tabla 2 Animales de traspatio en casas cuyos suelos mostraron positividad para *Leptospira*23

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Condiciones socioeconómicas que podrían contribuir a que los habitantes se expongan a la leptospirosis	24
Figura 2 Medición del pH de las muestras de suelo.....	25
Figura 3 Medición de humedad de las muestras de suelo.....	26

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad febril de gran relevancia ya que ha generado altas tasas de morbilidad en todo el mundo (Campos, 2014). Se estima que anualmente se tiene aproximadamente 1.03 millones de casos y más de 60 mil muertes a causa de esta enfermedad a nivel mundial (Costa, Hagan , Calcango , & Martinez, 2015). El mayor número de casos de leptospirosis humana está asociada principalmente a países con clima tropical y subtropical como es el caso de Ecuador (Karpagam & Ganesh, 2020). El microorganismo responsable de dicha enfermedad es una bacteria espiroqueta perteneciente al género *Leptospira* (Scheider, Casanovas, Hacker, & Elsio, 2018). Hasta el momento se han logrado identificar alrededor de 64 especies a las que se ha reclasificado en 4 subclados P1(patogénico), P2 (intermedio), S1 y S2 (saprófitos), de las cuales 37 especies pertenecen al grupo patogénico (Picardeau, 2020). Dentro de este grupo, se encuentra *Leptospira interrogans* que es una de especies patogénicas más conocidas (Romero & Falconar, 2016).

La infección por *Leptospira* inicia cuando la bacteria atraviesa la piel desgastada (con laceraciones) o las membranas mucosas como la boca, o nariz, para luego atravesar la barrera de la mucosa y migrar al torrente sanguíneo, en donde las bacterias se multiplicarán y diseminarán por diferentes órganos como los riñones, el sistema nervioso central, el bazo, entre otros (Ko, Goarant, & Picardeau, 2009). Leptospirosis al ser una zoonosis puede infectar a animales y humanos, principalmente a mamíferos y también algunos vertebrados de sangre fría como reptiles (Romero & Falconar, 2016). Estos animales pueden actuar como reservorios de la bacteria para el ser humano, debido a su cercanía con estos. Los roedores silvestres y peridomésticos (ej. ratas y roedores de campo), o mamíferos domésticos (ej. cerdos vacas y perros) son algunos ejemplos de reservorios animales (Organización Mundial de la Salud, 2008).

Las ratas son los principales reservorios de *Leptospira* en zonas urbanas, en cambio en las zonas rurales esta realidad es diferente ya que existen otros animales domésticos que toman mayor relevancia en la transmisión de dicha bacteria, como animales criados en el traspatio de las viviendas (ej. cerdos y vacas) (CDC, 2015). Además, debido al almacenamiento de granos de los cultivos en los exteriores de las casas de zonas rurales, la presencia de ratas es muy frecuente (CDC, 2015). Las personas involucradas en la crianza de los animales tienen mayor riesgo de contagio, ya sea por contacto directo al manipular al animal infectado, o por contacto indirecto, mediante la exposición al suelo o agua contaminados con la orina de estos animales (Organización Mundial de la Salud, 2008).

Las especies de *Leptospira* patógena se consideran ubicuas, pues están distribuidas en una gran cantidad de ambientes que incluyen agua y suelo (Vincent, et al, 2019). Incluso, se ha encontrado que los suelos que bordean los ríos pueden actuar como reservorios para dicha bacteria o reflejar la presencia de la misma (Miller, et al, 2021). Sin embargo, para que *Leptospira* patógena sobreviva en el ambiente, se deben tomar en cuenta varias condiciones, lo cual es clave para la transmisión de la bacteria a otro hospedador. En el caso de suelos de espacios peridomésticos, las altas precipitaciones y los bajos niveles de contaminación fecal, son condiciones que deben considerarse para que el suelo pueda constituir un importante foco de transmisión (Miller, et al, 2021).

Del mismo modo, existen otros aspectos importantes que también se deben tomar en cuenta, como el pH y la humedad. En cuanto al pH del suelo, se ha encontrado que en suelos ácidos (pH=5.5) esta bacteria puede permanecer viable incluso hasta 42 días, mientras que en suelos más neutros (pH≈7) puede sobrevivir hasta 74 días (Allen, 2015). De acuerdo con esto, se ha determinado que el rango de pH en suelos en el cual la *Leptospira* patógena podría vivir es de

aproximadamente 5.5 y 7.6 (Saito, et al, 2012; Hellstrom & Marshall, 1978; Khairani-Bejo, et al, 2004). Adicionalmente, la humedad juega un rol fundamental, por lo cual, para que la bacteria se mantenga viable en suelos, éstos deben tener un contenido de humedad mayor al 20% (Khairani-Bejo, et al, 2004; Barragán , Olivas, Keim, & Pearson , 2017). En este sentido, tanto el pH como la humedad son factores de gran relevancia para la supervivencia de *Leptospira* patógena en el ambiente.

De acuerdo a varios estudios, se ha observado que *Leptospira interrogans* tiene una gran capacidad de sobrevivir en suelos y sedimentos incluso más de 9 semanas manteniendo su virulencia (Bierque, Thibeaux, Girault, & et al , 2020). Así mismo, se han encontrado otras especies del subclado P1, dentro del grupo patogénico, en suelos como es el caso de *Leptospira kmety* (Slack, et al, 2009). Estudios basados en la detección de *Leptospira* en suelos han permitido identificar nuevas especies en muestras ambientales, sobre todo en aquellos sitios con inundaciones como el caso de Taiwán en el cual se detectó cerca del 30,6% en suelos agrícolas inundados y de igual manera se han encontrado resultados similares en los suelos de Brasil (Fuh, et al, 2011). Además, se ha aislado *Leptospira* con mayor frecuencia a partir de suelos en contraste con muestras de agua (Bierque, et al, 2020; Miller, et al, 2021). Así mismo, se ha visto que la supervivencia de *Leptospira* patógena en los suelos tiene una correlación positiva con la disponibilidad de nutrientes como el nitrato y con la presencia de metales como hierro, manganeso y cobre (Lall, Vinod, Raj, & Vedhagiri, 2018).

Existen varios métodos para detectar *Leptospira* en muestras ambientales, sin embargo, debido a la complejidad de estos análisis, una de las técnicas más recomendadas además del cultivo es la técnica de PCR (polymerase chain reaction), de la cual se han obtenido mejores resultados principalmente evaluando la presencia de esta bacteria en muestras como suelos y agua (Flores, et

al, 2020). Debido al continuo desarrollo de estos métodos se ha podido realizar una amplificación más específica y eficaz de *Leptospira* patógena en muestras como suelos (Muñoz, Mason, Encina, Astroza, & Romero, 2014). Esta técnica ha ayudado a detectar genes específicos como el gen *lipL32*, que además de ser un gen altamente conservado en el grupo patogénico, es importante porque codifica para la lipoproteína que conforma uno de los componentes principales de la superficie de la membrana externa de la bacteria, lo cual facilita la identificación de *Leptospira* patógena (Romero & Falconar, 2016).

El objetivo de este estudio es detectar ADN de *Leptospira* patogénica en muestras de suelos de una zona rural del cantón Rocafuerte, en la provincia de Manabí. Manabí es una de las provincias con mayor prevalencia de leptospirosis humana en el Ecuador (Ministerio de Salud Pública, 2020). Esta región además de poseer extensas áreas agrícolas, se caracteriza por la crianza de animales de traspatio. Por esta razón, habría la probabilidad de que las personas contraigan leptospirosis a partir de los animales domésticos y peridomésticos y/o del ambiente en donde viven.

MÉTODOS

Toma de muestras

Este estudio forma parte de una investigación más amplia que analiza la leptospirosis en la provincia de Manabí, estudio liderado por Verónica Barragán PhD. en el que participan como coinvestigadoras Patricia Zambrano MDV y Ligia Luna PhD. candidate. Los datos preliminares de este estudio identificaron una alta positividad de *Leptospira* en cerdos provenientes del cantón Rocafuerte. Es así que se seleccionó 3 comunas de este cantón (La California, El Cardón y Danzarín), para determinar la presencia de *Leptospira* patógena en suelos del peridomicilio de 6 casas. Los criterios establecidos para la toma de muestras fueron suelos que permanecieran húmedos y bajo sombra, condiciones que son necesarias para que *Leptospira* patógena sobreviva en el medio ambiente y por lo tanto incrementar la posibilidad de obtener ADN del patógeno (Parker & Walker, 2011). Una vez definidos los lugares de muestreo por cada vivienda, se procedió a tomar las muestras cerca de las casas (a 5 metros) y cerca de los corrales o lugares donde se encontraban los animales (a más de 5 metros). En total se tomaron 102 muestras de aproximadamente 200 gramos de suelo de 0 a 10 cm de profundidad que se colocaron en fundas zip-lock pequeñas. Además, del mismo sitio de la muestra se tomó alrededor de 30 gramos de suelo, se colocó en tubos Falcon de 15ml y se las conservó a 4°C.

También, se registraron datos que proporcionaron una idea del nivel socioeconómico de las viviendas muestreadas: el material de la vivienda, el acceso al agua, tipo de piso del patio, tipo de instalaciones sanitarias, presencia de animales de traspatio, tipo de alimento para los animales, almacenamiento de granos, observación de presencia de ratas y en comportamiento de los habitantes si las personas de las viviendas caminan descalzas.

Medición de pH de los suelos

Se utilizó el protocolo citado en Andrades (2015), el cual se describe a continuación. Se pesó 10 gramos de la muestra de suelo en la balanza y se colocó en un vaso de precipitación, a esto se añadió 50 ml de agua destilada y posteriormente se removió esta mezcla con la ayuda de un agitador magnético durante 5 minutos. Después se dejó reposar por 30 minutos y finalmente se midió el pH con el potenciómetro introduciendo los electrodos en la suspensión. Después de cada medición de pH se lavó los electrodos con agua destilada y se secó con papel filtro. Todo este procedimiento descrito se repitió para las 102 muestras de suelo.

Medición de humedad de suelos

Para medir la humedad se siguió el protocolo de Toledo (2020) que se describe a continuación. De cada muestra se tomó 10 miligramos de suelo, esto se pesó en una balanza analítica. Se registró este dato inicial (P_i) sin tomar en cuenta el peso del envase. Posteriormente se ingresó la muestra en el determinador de humedad Cobos MS-70, en donde se realizó la medición de ésta mediante un método gravimétrico. En otras palabras, por pérdida por secado, en donde se calentó la muestra de suelo a altas temperaturas y después se registró el valor obtenido del peso perdido a causa de la humedad que se evaporó. En este caso se tomó en cuenta el peso del suelo seco (P_f) sin el envase. Para obtener la humedad se calculó la diferencia de los pesos registrados dividido para el peso de la muestra seca: $((P_i - P_f)/P_f) * 100$. Es importante indicar que este proceso se hizo por triplicado y al final se obtuvo el promedio de estas tres mediciones de humedad para cada muestra.

Extracción de ADN y detección de *Leptospira* patogénica de suelos

La extracción de ADN de suelos se llevó a cabo usando el kit PowerSoil (Qiagen, 2017). Se tomó 0.25 gramos de la muestra de suelo en los tubos de PowerBead y se siguió las instrucciones de fabricante hasta obtener el ADN que se lo almacenó a -20°C. Por otra parte, la presencia de ADN de *Leptospira* fue detectada mediante la amplificación del gen *lipL32* usando la sonda TaqMan mediante la técnica de PCR en tiempo real (Stoddard, et al, 2009). Como control positivo se utilizó ADN de un cultivo de *Leptospira interrogans*. Las reacciones de PCR master mix fueron realizadas a un volumen final de 10 µl. El proceso de amplificación consistió en 2 minutos a 50°C y 10 minutos a 95°C, seguido de 44 ciclos de amplificación (95 °C por 15 segundos y 58°C por 60 segundos) (Stoddard, et al, 2009). Además, los productos de PCR fueron observados mediante el sistema de detección de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX96 Touch.

RESULTADOS

Detección de *Leptospira* patógena en muestras de suelo

Los resultados obtenidos de la amplificación del gen *lipL32* muestran que de las 102 muestras analizadas únicamente 4 fueron positivas para la detección de *Leptospira* patógena, lo que representó el 4% del total, mientras que el 96% fueron muestras negativas. En este caso, de las 6 casas muestreadas del cantón Rocafuerte, solamente la casa 2 (parroquia Rocafuerte), la casa 3 y 4 (parroquia La Seca) y la casa 5 (parroquia Danzarín) tuvieron muestras positivas (**Tabla 1**).

Observaciones sobre las condiciones socioeconómicas

De acuerdo a las observaciones sobre las condiciones las casas de donde se obtuvieron las 4 muestras positivas (casas 2, 3, 4 y 5), se encontró que éstas poseen características como pozos sépticos en cuanto a las instalaciones sanitarias, el tipo de patio es de tierra y todas poseen animales de traspatio (**Figura 1**). Además, se observó que las personas que habitan en las casas 4 y 5 tienen el hábito de caminar descalzas en el traspatio de sus casas. En el caso de las viviendas 2, 3 y 4 están elaboradas con cemento y el acceso al agua es mediante la red pública, mientras que la casa 5 es de palma/caña y acceden al agua mediante un carro repartidor. La vía de acceso principal para la casa 5 es mediante una calle empedrada, mientras que para la casa 4 es mediante una calle pavimentada y para las casas 2 y 3 es mediante una calle de tierra. Además, las muestras positivas de suelo de las viviendas 3 y 5 presentaban cercanía a los animales, mientras que las muestras de las viviendas 2 y 4 tenían cercanía a las casas. Así también, se encontró que en las viviendas 3 y 4 hay almacenamiento de granos cerca de las mismas.

De acuerdo con una entrevista realizada a los dueños de las casas se menciona que se ha observado la presencia de ratas durante el día, en todas las viviendas en donde se colectaron las

muestras que dieron resultados positivos para la presencia de ADN de *Leptospira*. En las casas 3, 4 y 5 se encontró que la mayor proporción de animales de traspatio corresponden a cerdos. Además, la casa 3 es la única de todas las viviendas positivas que presenta vacas, mientras que las casas 4 y 5 presentan 1 perro cada una. Por otro lado, en relación al tipo de alimento proporcionado a los animales, solo la casa 5 los alimenta con restos de comida, mientras que las casas 2, 3 y 4 los alimentan con balanceado (**Tabla 2**).

Mediciones de pH y humedad

De acuerdo a los resultados se obtuvo que de las 98 muestras de suelos negativas para *Leptospira* patógena, el 64% (63 muestras) tuvieron un pH entre 5.5- 7.6, mientras que el 53% (52 muestras) tuvieron un contenido de humedad mayor al 20%. Adicionalmente, se puede observar en la **Figura 2** que de las muestras positivas pertenecientes a las casas 2, 3, 4 y 5 se tuvo un pH de 7.6, 6.5, 8.2 y 7.7 respectivamente. De igual manera, se observa en la **Figura 3** que, según los datos obtenidos de la medición del porcentaje de humedad, de las muestras positivas, la casa 2 presentó el 25%, la casa 3 tuvo 14%, la casa 4 un 27% y la casa 5 tuvo un 33% de contenido de humedad.

DISCUSIÓN

Análisis de las condiciones socioeconómicas

Las condiciones socioeconómicas de las familias que habitan en las diferentes viviendas podrían cumplir un rol importante ya que podrían influenciar en la presencia de *Leptospira* patógena. De acuerdo a los resultados obtenidos, una característica común de las 4 viviendas, cuyos suelos fueron positivos para *Leptospira* patógena (casa 2, 3 4 y 5), es poseer un patio de tierra. La tierra al ser un material permeable y poroso puede ayudar a contener los desechos de los animales como la orina, fluido en el que se puede encontrar *Leptospira* patógena y el contacto con esta tierra puede exponer a las personas para contraer leptospirosis (Masuzawa, Sakakibara, & Saito, 2017).

Esto a su vez puede estar ligado con la presencia de animales de traspatio, ya que las casas 3, 4 y 5, en donde se obtuvieron muestras positivas, cuentan con cerdos, vacas y perros que como se mencionó anteriormente pueden ser transmisores de *Leptospira* (Sosa, 2015). En el caso de las viviendas 3 y 5, la positividad pudo estar relacionada con que las muestras fueron tomadas cerca de los animales. Estos animales pudieron haber estado infectados con la bacteria por lo que posiblemente contaminaron los suelos a través de su orina. Por su parte, la positividad de la muestra de la casa 4 pudo relacionarse con que ésta se tomó cerca de la casa en donde se encontraban perros. Estos animales también pueden actuar como portadores de leptospirosis y por lo tanto ser fuente de infección para el humano, considerando que los habitantes de estas viviendas tienen un contacto cotidiano más cercano con dichos animales (Ministerio de Salud , 2000).

A esto se le suma el caminar descalzo, que fue un comportamiento que se observó en dos casas (casa 4 y 5). Este es un aspecto de gran relevancia, considerando que una de las formas en

que *Leptospira* puede producir infección es ingresando por laceraciones en la piel y el caminar descalzo ha sido identificado como factor de riesgo (Suescún, Heredia, & Mulato, 2017)

Otra característica importante que se encontró es que, tanto para la casa 2 como para la casa 3, la vía de acceso principal es por medio de calles de tierra. Esta condición sumada a la falta de sistemas de alcantarillado podría representar un problema principalmente en temporadas lluviosas. En este caso el agua puede quedarse estancada formando charcos e incluso en zonas bajas se pueden producir inundaciones. Este aspecto es importante considerando que el agua puede servir como un vehículo de transmisión para la bacteria (Henry & Johnson, 1977).

Además, se observó que cerca de las casas 3 y 4 se almacenan granos como maní o maíz. Este aspecto también es importante pues los silos de granos son una fuente de alimento que atrae a las ratas. Los granos que se almacenan fuera de las casas constituyen un atrayente para estos roedores que son considerados como plagas en las zonas rurales (Caro, 1997). Adicionalmente, los moradores de todas las casas de las cuales se tuvieron muestras positivas, comentaron que observaron ratas en el peridomicilio durante la noche e incluso durante el día. Considerando que las ratas son principalmente animales nocturnos el observarlos durante el día sugiere que hay una gran cantidad de estos roedores en el peridomicilio de las casas (California Childcare Health Program, 2016). Si las ratas excretan *Leptospira* en su orina, pueden contaminar el alimento de los animales, fuentes de agua y el ambiente (Caro, 1997).

Todos estos aspectos mencionados anteriormente también se encontraron en las casas con muestras negativas (casa 1 y 6) por lo cual no se los puede tomar como factores que expliquen la presencia de *Leptospira* en los suelos con resultados positivos. No obstante, conforman aspectos que se deben tomar en cuenta ya que podrían incrementar la probabilidad de exponer a las personas a adquirir una infección con *Leptospira* patógena.

Análisis del pH y humedad

Los datos obtenidos de la mayoría de muestras negativas registran niveles de pH (5.5 - 7.6) y de humedad (>20%) adecuados, según otros estudios, para que la bacteria pueda sobrevivir en el suelo (Khairani-Bejo, et al, 2004; Barragán, et al, 2017). En este caso, a pesar de que las muestras de suelos tuvieron estas condiciones, no se detectó a la bacteria. De este modo, la obtención de resultados negativos puede explicarse por otros factores. Uno de ellos probablemente es porque los animales que están en la zona no están excretando *Leptospira*, o simplemente porque esta bacteria no está circulando en el área. Otra de las razones puede ser porque el ADN de la bacteria pudo haberse degradado y por esto no se logró su detección.

De acuerdo con la **Figura 2** se observan dos muestras de las casas 2 y 3 en donde sí se detectó el material genético de la bacteria, que presentaron un pH entre 5.5 y 7.6 considerado como adecuado para el crecimiento de *Leptospira* según otros estudios (Khairani-Bejo, et al, 2004; Barragán , Olivas, Keim, & Pearson , 2017). Este resultado también concuerda con otra investigación en donde se realizó un análisis comparativo de la presencia de *Leptospira* en muestras ambientales de suelo y agua, en el cual se menciona que los pH superiores a 6.2 no influyeron en la supervivencia y distribución de dicha bacteria en el suelo (Saito, Villanueva, Chakraborty, & Miyahara, 2012).

Con respecto a la humedad de los suelos, en donde se detectó ADN de *Leptospira* (**Figura 3**), se obtuvo que la mayoría de muestras positivas presentan condiciones de humedad (>20%) que según otras investigaciones son adecuadas para el crecimiento de esta espiroqueta (Khairani-Bejo, et al, 2004; Barragán, et al, 2017). Esto igualmente concuerda con otros estudios en donde se ha detectado *Leptospira* patógena en suelos que sobrepasan incluso el 65% de contenido de humedad (Henry & Johnson, 1977).

CONCLUSIONES

De las 102 muestras de suelos recolectados del cantón Rocafuerte, se encontraron muestras positivas para *Leptospira* patógena en 4 de las 6 viviendas analizadas. Cabe señalar que las condiciones socioeconómicas como el poseer patio de tierra, el caminar descalzo y la presencia de animales de traspatio como los cerdos, vacas y perros, no son determinantes para la presencia de la bacteria en este estudio. Sin embargo, se deberían tomar en cuenta ya que pueden contribuir con la transmisión de la misma y por ende incrementar la posibilidad de contagio tanto para animales como para humanos. Lo mismo sucede con las ratas que en caso que de estar infectadas podrían contaminar los alimentos, fuentes de agua y suelos con su orina (Ospina, et al, 2017). Otros aspectos que son importantes para la supervivencia de *Leptospira* en el suelo son los altos porcentajes de humedad, ya que su detección se ha encontrado relacionada con estas condiciones (Saito, Villanueva, Chakraborty, & Miyahara, 2012). Sin embargo, a pesar de que las muestras de suelo cumplen con los niveles adecuados de pH y humedad, los resultados pueden ser negativos para la detección de ADN de *Leptospira* patógena. Es decir, la presencia de este patógeno no sólo depende de estas condiciones, pues también se debería tomar en cuenta otros factores como las precipitaciones, la disponibilidad de nutrientes del suelo, entre otros, que podrían influenciar en la presencia de la misma (Lall, Vinod, Raj, & Vedhagiri, 2018). Asimismo, los resultados negativos pueden explicarse porque la bacteria posiblemente no está circulando por las zonas analizadas y por ende los animales no la están excretando. Finalmente, se requieren más estudios a futuro en donde se realice cultivo de la bacteria a partir de los suelos de estas zonas para comprender más acerca de las condiciones a las cuales se encuentra *Leptospira* patógena.

TABLAS

Tabla 1 Resultados de la amplificación del gen *liL32* en muestras de suelo

<i>Número de casa</i>	<i>Muestras positivas*</i>
<i>Casa 1</i>	0 (n=20)
<i>Casa 2</i>	1 (n=12)
<i>Casa 3</i>	1 (n=25)
<i>Casa 4</i>	1 (n=15)
<i>Casa 5</i>	1 (n=15)
<i>Casa 6</i>	0 (n=15)
<i>TOTAL</i>	4 (n=102)

Tabla 2 Animales de traspatio en casas cuyos suelos mostraron positividad para *Leptospira*. En color amarillo se resaltan los parámetros más importantes que poseen las casas analizadas con respecto a la presencia de animales de traspatio.

Animales en viviendas	Muestras positivas	Número de casa			
		Casa 2	Casa 3	Casa 4	Casa 5
Presencia de ratas en el día	4/4	SI	SI	SI	SI
Animales de traspatio	Gallinas	SI	SI	SI	SI
	Cerdo	NO	SI	SI	SI
	Vaca	NO	SI	NO	NO
	Perro	NO	NO	SI	SI
Tipo de alimento	Balanceado	SI	SI	SI	NO
	Restos de comida	NO	NO	NO	SI

FIGURAS

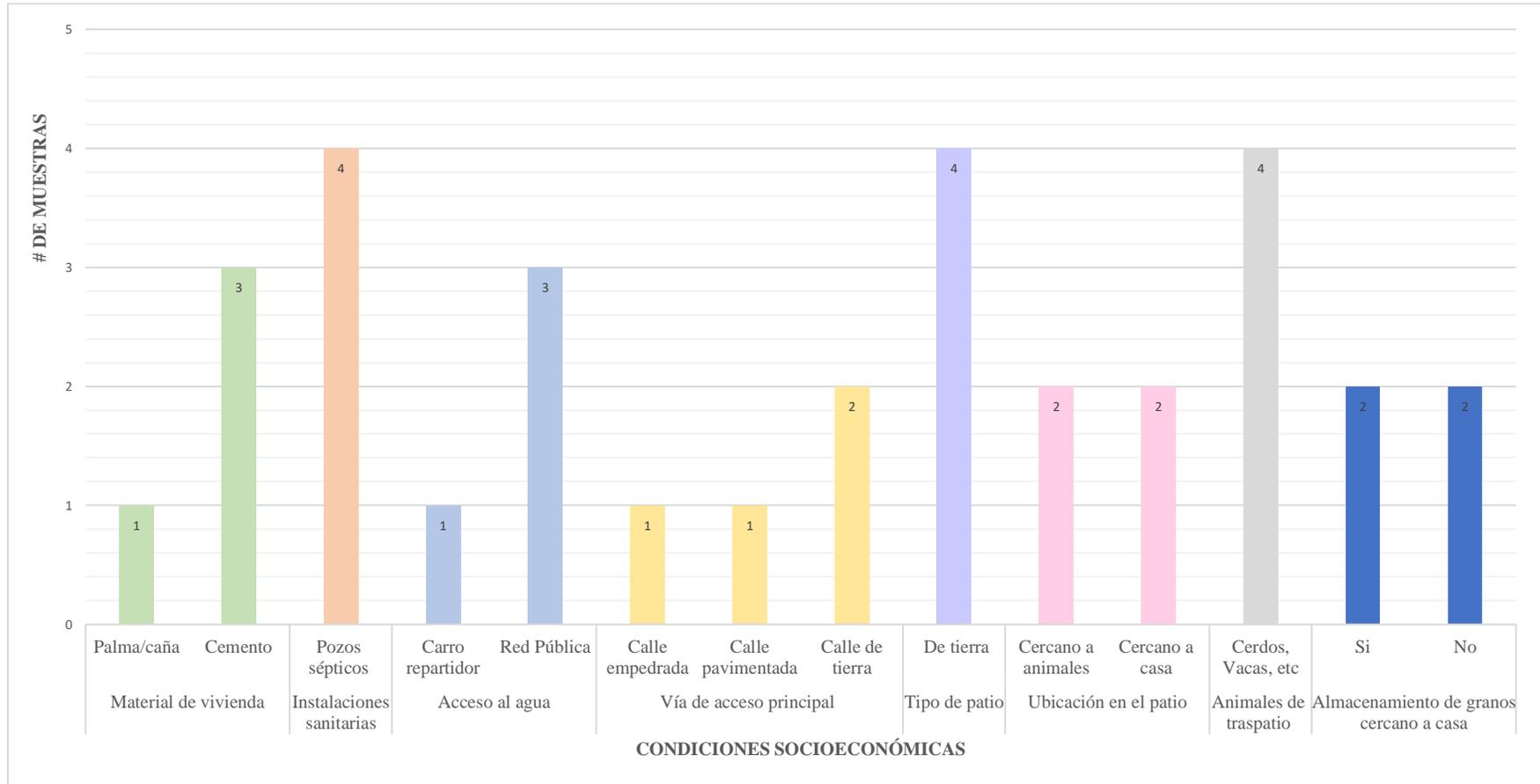


Figura 1 Condiciones socioeconómicas que podrían contribuir a que los habitantes se expongan a la leptospirosis. En el eje de las Y se observa la cantidad de muestras positivas y en el eje de las X la cantidad de casas que presentan los diferentes factores socioeconómicos observados.

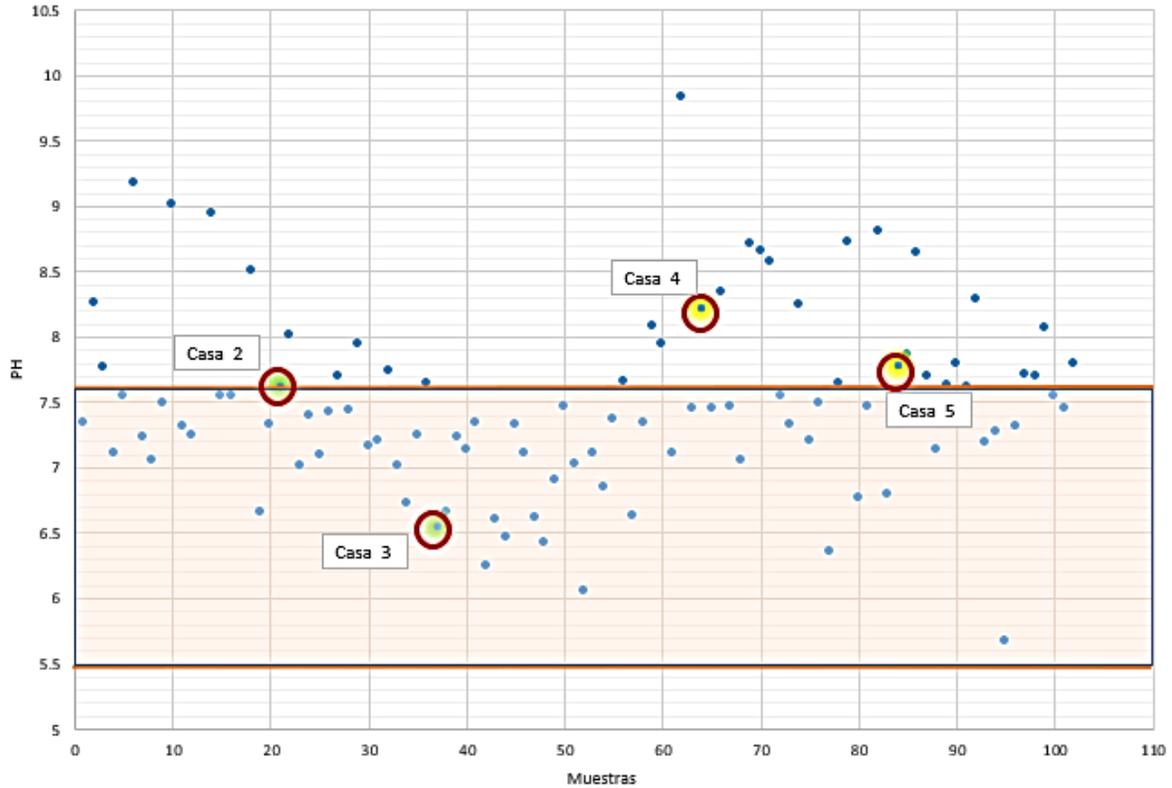


Figura 2 Medición del pH de las muestras de suelo.

En este gráfico se muestra en círculos rojos las muestras positivas para *Leptospira* patógena y de éstas las que presentan un sombreado verde son aquellas que presentan un pH entre 5.5 y 7.6, mientras que las que están sombreadas con amarillo son las que están fuera de este rango. El resto de puntos azules corresponden a las muestras negativas.

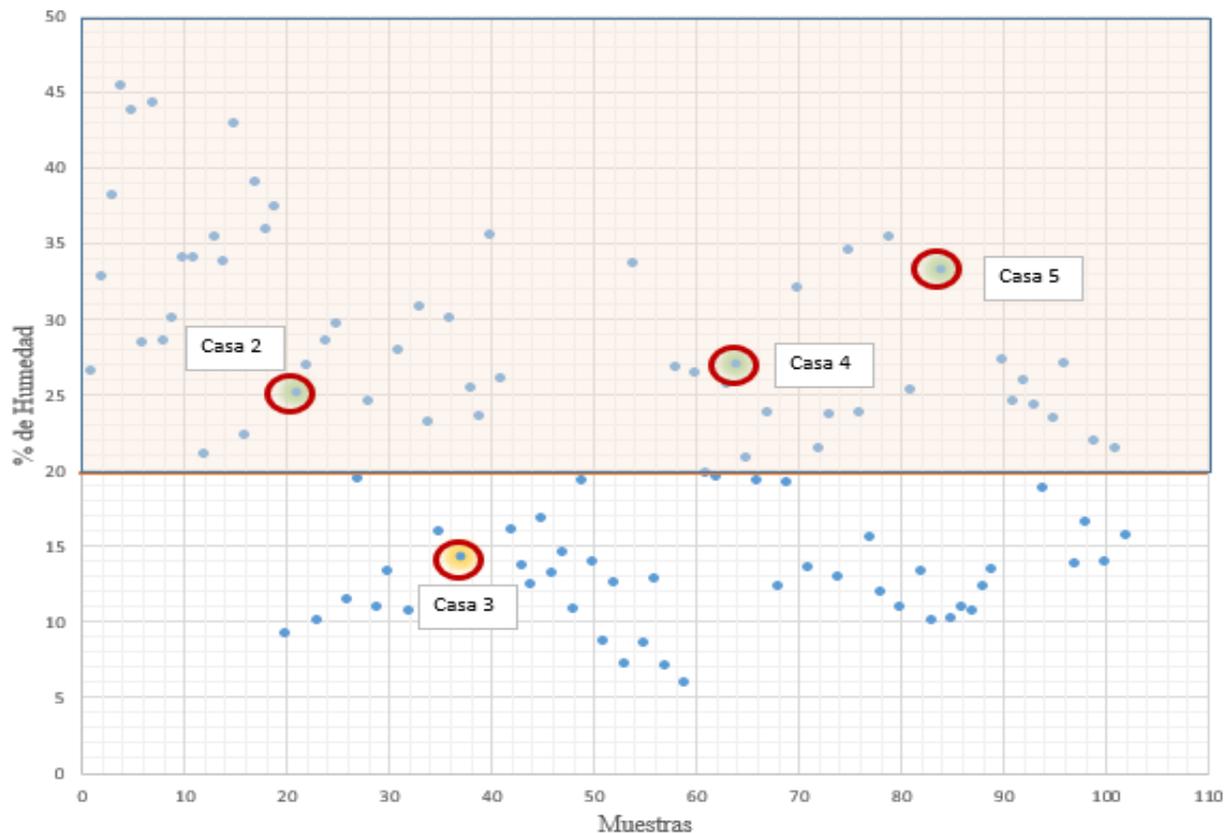


Figura 3 Medición de humedad de las muestras de suelo.

En este gráfico se muestra en círculos rojos las muestras positivas para *Leptospira* patógena y de éstas las que presentan un sombreado verde son aquellas que tienen un porcentaje de humedad mayor al 20%, mientras que la que está sombreada con amarillo tiene un porcentaje menor al 20%. El resto de puntos azules corresponden a las muestras negativas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, C. (2015). *Evaluation of Soil as a Risk Indicator for Human Leptospirosis in Coastal, Rural Ecuador*. <https://scholarcommons.usf.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=6993&context=etd>
- Andrades, M., Moliner, A., & Masaguer, A. (2015). *Prácticas de edafología: Métodos didácticos para análisis de suelos*. La Rioja: Universidad de La Rioja.
- Barragán , V., Chiriboga, J., Miller, E., Olivas, S., Birdsell, D., Hepp, C., & Honstra, H. (2016). High *Leptospira* Diversity in Animals and Humans Complicates the Search for Common Reservoirs of Human Disease in Rural Ecuador. *PLOS Neglected Tropical Disease*, 10(9), 1-14. doi:10.1371/journal.pntd.0004990
- Barragán , V., Olivas, S., Keim, P., & Pearson , T. (2017). Critical Knowledge Gaps in Our Understanding of Environmental Cycling and Transmission of *Leptospira* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(19). doi:10.1128/AEM.01190-17
- Bierque, E., Thibeaux, R., Girault, D., & et al . (2020). A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. *PloS one*, 15(1). doi:10.1371/journal.pone.0227055
- California Childcare Health Program. (2016). *Manejo integrado de plagas: ratas y ratones*. https://cchp.ucsf.edu/sites/g/files/tkssra181f/RatsMice_FCCH_IPM_Sp.pdf
- Campos, N. (2014). Leptospirosis. *Medicina Legal de Costa Rica*, 31(2), 9-15.
- Caro, A. (1997). *Manual sobre administración de bodegas de alimentos*. Quito: FAO. <https://coin.fao.org/coin-static/cms/media/20/13950925849400/c12.pdf>
- CDC. (2015). *Leptospirosis: Infection*. <https://www.cdc.gov/leptospirosis/infection/index.html>

- Costa, F., Hagan , J., Calcango , J., & Martinez, P. (2015). Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A systematic Review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(9). doi:10.1371/journal.pntd.0003898
- Flores, B., Escobar, K., Muzquiz, J., Sheleby, J., Mora , B., Roque, E., . . . Jirón, W. (2020). Detection of Pathogenic Leptospire in Water and Soil in Areas Endemic to Leptospirosis in Nicaragua. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 5(149), 1-10. doi:10.3390/tropicalmed5030149
- Fuh, Y., Shia, W., Lee, W., Shyu, C., Wang, C., & et al. (2011). The use of commercial soil nucleic acid extraction kit and nested PCR for detection of *Leptospira* in farm environment after flooding in Taiwan. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 41, 493-498.
- Hellstrom, J., & Marshall, R. (1978). Survival of *Leptospira interrogans* serovar Pomona in an acidic soil under simulated New Zealand field conditions. *Res Vet Sci*, 25, 29-33.
- Henry, R., & Johnson, R. (1977). Distribution of the Genus *Leptospira* in Soil and Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 35, 492-499.
- Karpagam, B., & Ganesh, B. (2020). Leptospirosis: a neglected tropical zoonotic infection of public health importance—an updated review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 39(1), 1-12. doi:10.1007/s10096-019-03797-4
- Khairani-Bejo, S., Bahaman, A., Zamri-Saad, M., & Mutalib, A. (2004). The survival of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in the Malaysian environment. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 3, 123-129.

- Ko, A., Goarant, C., & Picardeau, M. (2009). *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature*, *7*, 736-747. doi:10.1038/nrmicro2208
- Lall, C., Vinod, K., Raj, R., & Vedhagiri, K. (2018). Correlation Between Physicochemical Properties of Soil and Presence of *Leptospira*. *EcoHealth*, *15*, 670-675. doi:10.1007/s10393-018-1346-1
- Martin, P., Arauz, M., & Stanchi, N. (2015). Diagnóstico de leptospirosis mediante técnicas moleculares: ventajas y limitaciones en Medicina Veterinaria. *Analecta Vet*, *3*(1), 26-38.
- Masuzawa, T., Sakakibara, K., & Saito, M. (2017). Characterization of *Leptospira* species isolated from soil collected in Japan. *Microbiology and Immunology*, *62*, 55-59. doi:10.1111/1348-0421.12551
- Miller, E., Barragán, V., Chiriboga, J., Weddell, C., Luna, L., Jiménez, D., & Aleman, J. (2021). *Leptospira* in river and soil in a highly endemic area of Ecuador. *BMC Microbiol*, *21*(17). doi:10.1186/s12866-020-02069-y
- Ministerio de Salud . (2000). *Leptospirosis*. <https://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/m%C3%B3dulo%20t%C3%A9cnico%20leptospirosis.pdf>
- Ministerio de Salud Pública. (2020). *Enfermedades zoonóticas: Leptospira SE 35 Ecuador 2020*. <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2020/09/Leptospira-SE-35.pdf>
- Muñoz, C., Mason, M., Encina, C., Astroza, A., & Romero, A. (2014). *Leptospira* Contamination in Household and Environmental Water in Rural Communities in Southern Chile.

International Journal of Environmental Research and Public Health, 11, 6666-6680.
doi:10.3390/ijerph110706666

Organización Mundial de la Salud. (2008). *Leptospirosis humana: Guía para el diagnóstico, vigilancia y control*. <https://paho.org/hq/dmdocuments/WHO-Guia-Lepto-2003-Spa.pdf>

Ospina, C., Rincón, M., Soler, D., & Hernández, P. (2017). Papel de los roedores en la transmisión de *Leptospira* spp. en granjas porcinas. *Revista de Salud Pública*, 19(4), 555-561.

Parker, J., & Walker, M. (2011). Survival of a pathogenic *Leptospira* serovar in response to combined in vitro pH and temperature stress. *Veterinary Microbiology*, 152(1-2), 146-150.
doi:10.1016/j.vetmic.2011.04.028

Picardeau, M. (2020). *Leptospira* and Leptospirosis. *Methods in Molecular Biology*, 271-275.
doi:10.1007/978-1-0716-0459-5

Qiagen. (2017). *DNeasy PowerSoil Kit Handbook*. QIAGEN.

Romero, C., & Falconar, A. (2016). *Leptospira* spp. y leptospirosis humana. *Salud Uninorte*, 32(1), 123-143.

Rosales, E. (s.f). Tanques sépticos. Conceptos teóricos base y aplicaciones. *Tecnología en Marcha*, 18(2), 26-33.

Saito, M., Villanueva, S., Chakraborty, A., & Miyahara, S. (2012). Comparative analysis of *Leptospira* strains isolated from environmental soil and water in the Philippines and Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(2), 601-609. doi:10.1128/AEM.02728-12

- Scheider, A., Casanovas, A., Hacker, K., & Elsie, W. (2018). Quantification of pathogenic *Leptospira* in the soils of a Brazilian urban slum. *Plos Neglected Tropical Disease*, 12(4). doi:10.1371/journal.pntd.0006415
- Sedano, A., Pinto, C., Siuce, J., & Calle, S. (2016). Estandarización de una Técnica de PCR en Tiempo Real con Sondas TaqMan para la Detección de *Leptospira* spp Patógenas en Orina de Canes Domésticos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 27(1). doi:10.15381/rivep.v27i1.11454
- Slack, A., Khairani-Bejo, S., Syamonds, M., Dohnt, M., Stergerwalt, A., & Smythe, L. (2009). *Leptospira kmetyi* sp. nov., isolated from an environmental source in Malaysia. *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(4), 705-708. doi:10.1099/ijs.0.002766-0
- Sosa, A. (2015). *Estudio Piloto: Detección de Leptospira en el cantón Portoviejo (Manabí)*. <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/4887/1/120361.pdf>
- Stoddard, R., Gee, J., Wilkins, P., McCaustloand, K., & Hoffmaster, A. (2009). Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 64, 247-255. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014
- Suescún, S., Heredia, D., & Mulato, Y. (2017). Seroprevalencia de infección por *Leptospira* y factores de riesgo en estudiantes de una universidad de Colombia. *NOVA*, 15(27), 131-138.
- Toledo, M. (2020). *Determinación del contenido de humedad*. https://www.mt.com/mx/es/home/applications/Laboratory_weighing/moisture-content-determination.html#publications

- Vincent, A., Schiettekatte, O., Goarant, C., Kumari, V., Bernet, E., Thibeaux, R., & Nabilah, I. (2019). Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *13*(5), 1-25. doi:10.1371/journal.pntd.0007270
- Waktole, Y., Bashahum, M., & Nejash, A. (2016). Leptospirosis in Animal and its Public Health Implications: A Review. *World Applied Sciences Journal*, *34*(6), 845-853. doi:10.5829/idosi.wasj.2016.34.6.103113
- Yutsi, D., Arboleda, M., & Agudelo, P. (2013). Factores de riesgo sociales y ambientales relacionados con casos de leptospirosis de manejo ambulatorio y hospitalario, Turbo, Colombia. *Biomédica*, *33*(1), 117-129. doi:10.7705/biomedica.v33i0.1457