

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**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.**

BERNARDO MIGUEL GUTIÉRREZ GRANJA

Verónica Barragán, M.Sc., Directora de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención de título de B.Sc. en
Biotecnología

Quito, Mayo 2013

Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales
HOJA DE APROBACION DE TESIS

Título de la tesis: 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.

Bernardo Miguel Gutiérrez Granja

Verónica barragán, M.Sc.

.....

Directora de Tesis

Gabriel Trueba, PhD

.....

Miembro del Comité de Tesis

María de Lourdes Torres, PhD

.....

Miembro del Comité de Tesis

Stella de la Torre, PhD

.....

Decana del Colegio de Ciencias

Biológicas y Ambientales

Cumbayá, Mayo de 2013

© 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: Bernardo Miguel Gutiérrez Granja

C. I.: 171177895-9

Fecha: Mayo de 2013

Dedicatoria

Para mi padre, Eduardo Julio Gutiérrez Freyberg, quien sin ser científico sembró en mi la curiosidad de uno.

Dedicado a las miles de vidas dedicadas a descifrar las pequeñas piezas del rompecabezas que es el universo, lo que nos rodea y lo que somos.

Agradecimientos

Agradezco a mi directora de tesis, Verónica Barragán y Gabriel Trueba, por al apoyo inagotable durante el desarrollo de este proyecto, por toda su paciencia en los momentos difíciles y su guía en los aspectos técnicos y científicos de esta tesis.

También agradezco a María de Lourdes Torres, Venancio Arahana, Sonia Zapata, Renato León, Stella de la Torre, y todos mis profesores quienes, durante toda mi carrera universitaria, me han enseñado y dado las herramientas necesarias para poder contribuir con el avance del conocimiento científico.

A mis amigos y hermanos biotecnólogos, a quienes admiro infinitamente y quienes han sido más que un apoyo durante todos estos años. Gracias Vivi, Cris, Dani, Juanjo, Dianita, Marisa, Clau, Darío, Jenny, Cami, Jo, Meche, y todos los demás “biotecs”.

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología, por el apoyo que me han dado durante esta tesis, en especial a María Eugenia Mejía por el pequeño entrenamiento en el cultivo de *Leptospira*, a Jorge Chiriboga por todo el apoyo que ha sido para mí durante el desarrollo de esta tesis, y a todos quienes estuvieron ahí, incluso acompañándome durante mis poco ortodoxos horarios de trabajo (gracias Lu, Marce y Sofi).

Finalmente, gracias a mi mamá, Mónica, y a mi hermano, Sebastián, porque sin ustedes dos nada de esto tendría sentido. Esta tesis está plasmada en papel hoy día gracias a ustedes.

Resumen

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial, y un problema de salud considerable en el Ecuador. Esta enfermedad, causada por bacterias del género *Leptospira*, se transmite comúnmente a través de fuentes de agua y suelos contaminados con orina de mamíferos infectados. Por esta razón, el monitoreo de fuentes de agua de uso común en zonas de riesgo es una herramienta importante para comprender la aparición de brotes de esta enfermedad. El presente estudio utilizó una estrategia de PCR convencional y PCR en tiempo real (Real Time PCR) para determinar la presencia de especies patógenas de *Leptospira* en muestras de agua de río en dos provincias ecuatorianas. Se utilizaron cebadores específicos para los genes *secY* y *lipL32* de especies patógenas de *Leptospira*. Adicionalmente se determinó la presencia de especies intermedia de *Leptospira* utilizando cebadores específicos para una secuencia del gen que codifica para el 16S rRNA. Los resultados mostraron la presencia de especies patógenas en un total de 8 muestras: 6 correspondientes a la provincia de Esmeraldas y 2 correspondientes a la provincia de Manabí. El secuenciamiento de los productos de PCR del gen *lipL32* permitió identificar la especie de *Leptospira* presente en 8 de las 9 muestras. También se encontró la presencia de 13 muestras de agua positivas para especies intermedias, de las cuales 9 fueron también positivas para especies de *Leptospira* patógena. Los resultados de este proyecto proveen una herramienta importante para futuros estudios de monitoreo de *Leptospira* patógena en fuentes de agua.

Abstract

Leptospirosis is a zoonotic disease of worldwide distribution, and a considerable public health problem in Ecuador. This disease, caused by bacteria from the genus *Leptospira*, is commonly transmitted through water and soil contaminated with urine from infected mammals. For this reason, monitoring commonly usable water sources from risk areas is an important tool for understanding the development of leptospirosis outbreaks. This study presents a conventional PCR and real time PCR strategy for the detection of pathogenic species of *Leptospira* in water samples from two Ecuadorian provinces. For this purpose, *Leptospira* specific primers were used targeting the *secY* and *lipL32* genes. Additionally, the presence of intermediate species was determined using primers that target a sequence of the 16S ribosomal gene. Our results show the presence of pathogenic species in 8 samples: 6 corresponding to the province of Esmeraldas and 2 corresponding to the Province of Manabí. The sequence analysis of these samples for the *lipL32* PCR products allowed for the identification of the species present in 8 out of 9 samples. We also found the presence of 13 positive water samples for intermediate species, out of which 9 samples were also positive for pathogenic species of *Leptospira*. The results of this project provide with an important tool for future studies of pathogenic *Leptospira* monitoring in water sources.

Tabla de Contenido

1.	Introducción	12
1.1.	El género <i>Leptospira</i>	12
1.2.	La leptospirosis	13
1.2.1.	Características y Síntomas	13
1.2.2.	Epidemiología y vías de contagio	14
1.2.2.1.	Importancia del agua en la transmisión de la leptospirosis	15
1.2.2.1.	Distribución	16
1.2.3.	La leptospirosis en el Ecuador	17
1.3.	La reacción en cadena de la polimerasa	17
1.3.1.	El PCR como herramienta para detectar microorganismos patógenos y sus aplicaciones en epidemiología	19
1.3.2.	Detección de patógenos en muestras ambientales y de agua mediante PCR	20
2.	Objetivo General	21
3.	Objetivos Específicos	21
4.	Área de estudio	22
5.	Justificación	22
6.	Materiales	23
6.1.	Colección y recuperación de muestras de agua de río	23
6.2.	Extracción de ADN	23
6.3.	Diseño y selección de primers	24
6.4.	Reacciones de PCR convencional	24
6.5.	Reacciones de PCR en Tiempo Real	24
6.6.	Secuenciamiento y análisis de secuencias	25
7.	Métodos	25
7.1.	Localidades	25
7.2.	Colección de muestras de agua de río y recuperación <i>Leptospira</i> spp.	25
7.3.	Extracción de ADN	26
7.4.	Primers para la amplificación de especies patógenas de <i>Leptospira</i> a partir de muestras de agua y reacciones de PCR y qRT-PCR	27
7.4.1.	Selección y diseño de primers	27
7.4.2.	Reacciones de PCR convencionales	28

7.4.2.1.	PCR convencional con primers 16SV3 (Muyzer <i>et al</i> , 1993)	28
7.4.2.2.	PCR convencional con primers AB/CD (Mérien <i>et al</i> , 1992)	28
7.4.2.3.	PCR convencional con primers A-Inter/C-Inter	28
7.4.2.4.	PCR convencional con primers secYIV (Ahmed <i>et al</i> , 2009).....	29
7.4.2.4.1.	Límite inferior de detección con primers secYIV.....	29
7.4.2.5.	PCR convencional con primers LipL32.....	29
7.4.2.5.1.	Límite inferior de detección primers LipL32	30
7.4.3.	Reacciones de PCR en tiempo real.....	30
7.4.3.1.	PCR en tiempo real con primers LipL32	30
7.5.	Secuenciamiento de amplicones y análisis de secuencias	30
8.	Resultados	31
8.1.	Recuperación de ADN	31
8.2.	Detección de <i>Leptospira</i> en muestras de agua	32
8.2.1.	<i>Identificación de especies patógenas</i>	32
8.2.1.1.	<i>Primers lipL32</i>	32
8.2.1.1.1.	<i>Límite de detección de primers Lip32</i>	32
8.2.1.2.	Primers secYIV	32
8.2.1.2.1.	<i>Límite de detección</i>	33
8.3.	Análisis de secuencias	33
9.	Discusión	35
10.	Conclusiones.....	39
11.	Recomendaciones	39
12.	Referencias	41
13.	Tablas	48
14.	Figuras	54
15.	Anexos.....	62

Índice de Tablas

Tabla 1	48
Tabla 2	51
Tabla 3	52
Tabla 4	53

Índice de Figuras

Figura 1	54
Figura 2	55
Figura 3	56
Figura 4	57
Figura 5	58
Figura 6	59
Figura 7	60
Figura 8	61

Índice de Anexos

Anexo 1	62
---------------	----

1. Introducción

1.1. El género *Leptospira*

Las bacterias pertenecientes al género *Leptospira* son espiroquetas Gram negativas, que alcanzan longitudes entre 6 y 20µm. Se caracterizan por sus estructuras flagelares complejas, que a diferencia de otros flagelos se insertan en el espacio periplásmico y permiten su movimiento característico. No existe una morfología claramente diferencial de especies o tipos de *Leptospira*, puesto que durante series de subcultivos *in vitro*, la morfología de una cepa puede ir variando. Las estructuras del lipopolisacárido de *Leptospira* son similares a las de otras bacterias Gram negativas, pero tienden a presentar una menor endotoxicidad (Levett, 2001).

Históricamente, el género *Leptospira* ha sido clasificado taxonómicamente en base a anticuerpos específicos producidos contra ciertas especies (Levett, 2001). Sin embargo, técnicas modernas de genotipificación (Ahmed *et al*, 2006, Ahmed *et al*, 2011) han permitido obtener un conocimiento más detallado sobre la taxonomía de esta bacteria. En la actualidad, todas las especies conocidas de este género se clasifican en 3 clusters o agrupaciones principales. De las 20 especies identificadas en este género mediante análisis molecular taxonómico (16 especies identificadas y 4 genomoespecies recientemente asignadas nombres binomiales completos) (Smythe *et al*, 2012), existen 8 que se han identificado como patógenas (capacidad de generar infecciones en hospederos animales y humanos) (Levett & Smythe, 2008). Otras se agrupan en un grupo como especies saprofitas, es decir, que no han sido aisladas de hospederos humanos o animales y que únicamente se han identificado a partir de muestras ambientales. Finalmente, a un tercer grupo pertenecen las especies intermedias, de las cuales se desconoce su patogenicidad y han sido aisladas de muestras humanas o animales, pero taxonómicamente distintas de las especies patógenas (Perolat *et al*, 1998).

Las condiciones de cultivo para *Leptospira* son complejas, dependiendo de un ambiente aeróbico, con temperaturas óptimas de crecimiento de entre 28°C y 30°C. Se desarrollan en medios de cultivo mínimos enriquecidos con vitaminas, ácidos grasos de cadena larga como única fuente de carbono y sales de amonio. Son organismos catalasa y oxidasa positivos (Levett, 2001), y su cultivo tiende a ser tedioso y consume gran cantidad de tiempo (Ganoza *et al*, 2006). Debido a esto, la detección de ADN de *Leptospira* en muestras de agua y muestras clínicas mediante técnicas

moleculares resulta ser un reto importante para la detección de este patógeno y su consecuente monitoreo.

1.2. La leptospirosis

1.2.1. Características y Síntomas

También conocida como enfermedad de Weil en sus manifestaciones más severas, la leptospirosis ha sido reconocida en los últimos años como un problema de salud pública a nivel global, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo (Vijayachari *et al*, 2008; Slack, 2010). Su relevancia como una de las enfermedades emergentes más importantes a nivel global radica en su capacidad zoonótica: paso de hospederos animales hacia hospederos humanos. Adicionalmente, la sintomatología variada e inespecífica que produce, en combinación con la dificultad de diagnosticar la enfermedad, hacen de la leptospirosis una enfermedad de alto impacto, especialmente en países de zonas cálidas (Vijayachari *et al*, 2008).

El grado de severidad de la infección es amplio, variando entre infecciones sub-clínicas hasta fallo renal crónico, el cual fue descrito por primera vez por Adolf Weil en 1886 (de ahí el nombre, enfermedad de Weil). La presentación clínica de la leptospirosis es bifásica, presentando una fase septicémica y una fase inmunológica. Durante la primera fase, que dura aproximadamente una semana (7-10 días), el paciente presenta bacteremia, y las bacterias pueden ser cultivadas a partir de muestras de sangre. Durante la segunda fase se produce bacteruria, y el paciente mostrará una producción elevada de anticuerpos contra el microorganismo (Levett, 2001). Los síntomas típicos de la fase temprana de la infección son fiebre alta, síndrome pseudogripal, escalofríos, dolores musculares y dolores de cabeza. En la fase aguda, el paciente puede presentar fallo multiorgánico que incluye daño hepático (causante de ictericia), deficiencia renal, entre otras (Utzinger *et al*, 2012). Varios reportes indican incluso manifestaciones pulmonares y respiratorias severas (Helmerhorst *et al*, 2012). También se han reportado infecciones en sistema nervioso, como de meningitis o meningoencefalitis (Utzinger *et al*, 2012), y se ha encontrado presencia de la bacteria en infecciones oculares (Levett, 2001).

Es importante generar una distinción entre la enfermedad anictérica y la ictérica. La gran mayoría de los casos presentan la forma anictérica de la enfermedad, caracterizada por estados febriles repentinos y mialgia, casos que normalmente se resuelven durante la fase donde se detecta el inicio de producción de anticuerpos por el paciente. Esto no es el caso de la leptospirosis ictérica,

asociada con niveles elevados de bilirrubina en suero (incluso si no se ha detectado presencia de daño necrótico en hígado), y que es causa común de fallo renal agudo (hasta el 40% de los pacientes con leptospirosis icterica pueden presentar esta condición). Esta condición puede normalizarse con hidratación, pero puede requerir de diálisis para resolver completamente (Levett, 2001).

1.2.2. Epidemiología y vías de contagio

La epidemiología en el género *Leptospira* está cercanamente relacionada con su ciclo de vida. Los principales reservorios de la bacteria son varias especies de mamíferos (portadores asintomáticos), que no solo incluyen a perros, vacas, cerdos, ratones y ratas, sino que se expande hacia erizos, topos e incluso marsupiales. En otros casos, también se ha identificado presencia de *Leptospira* en mamíferos marinos como focas o lobos marinos, anfibios, serpientes y algunos peces de agua dulce (Ko *et al*, 2009). La leptospira se mantiene en los riñones y túbulos renales para luego ser eliminada a través de la orina (Haake, 2006). El ciclo de infección inicia en los animales, quienes secretan al microorganismo en su orina, contaminando fuentes de agua y suelos a través de los cuales la bacteria puede infectar a seres humanos y otros animales. El contagio a humanos se da por contacto directo con suelo o agua contaminados y por contacto directo con mamíferos domésticos infectados (Ko *et al*, 2009). Estas especies de animales liberan la bacteria directamente hacia suelos y fuentes de agua dulce, contaminándolas y permitiendo su transmisión hacia otros mamíferos. Se ha visto relación de especies y serovares de *Leptospira* con determinadas especies de mamíferos, este es el caso de *L. interrogans* serovar Icteriohemorrhagiae, cuyo reservorio típico corresponde a ratas (Shi Jun *et al*, 2012).

Como se mencionó previamente, la importancia de los reservorios animales en el ciclo de vida de *Leptospira* significa que éstos son también un factor de riesgo en el contagio de leptospirosis. El riesgo laboral debe considerarse cuando se trabaja con ganado, ya que es común el desarrollo de estados febriles a causa de esta bacteria, conocidos como fiebre de lechero (Huitema *et al*, 1989). Adicionalmente, se ha reportado una relación entre la presencia de roedores y la leptospirosis, un fenómeno particularmente evidente en zonas tropicales (Ganoza *et al*, 2006).

Una de las particularidades del género *Leptospira* es su capacidad para sobrevivir en el medio ambiente por semanas y meses, particularmente en suelos húmedos y en agua (Ganoza *et al*,

2006). Esto sugiere que algunas de las principales vías de contagio para la leptospirosis corresponden precisamente al contacto con fuentes de agua o suelos contaminados. Este fenómeno se ve reflejado en los numerosos casos ocasionados por contacto directo con agua por actividades recreativas (Monahan *et al*, 2009; Arcilla *et al*, 2012; Chusri *et al*, 2012). También hay reportes de contagio en escenarios que van desde operaciones militares y de rescate (Grambusch & Hoedebecke, 2012; Sopianet *al*, 2012) hasta brotes posteriores a periodos de inundaciones en distintas zonas (Dechetet *al*, 2012; Smith *et al*, 2012). Hasta el momento la evidencia que respalda la supervivencia de *Leptospira* patógena en fuentes de agua ha sido fundamentada por su capacidad de agregación celular en medios sin nutrientes (Trueba *et al*, 2004) y la formación de biofilm sobre superficies abióticas (Ristow *et al*, 2008). La dinámica de la formación de biofilms en este género no es clara aún, pero se ha visto que este fenómeno es más común en sustratos viscosos con ausencia de nutrientes y estrés osmótico del medio (Trueba *et al*, 2004). También se ha reportado que cuando se adiciona nutrientes sobre este biofilm las bacterias se liberan y replican rápidamente (Barragán *et al*, 2011).

Algunos factores de riesgo para contraer leptospirosis son caminar con pies descalzos alrededor de la residencia, uso de agua de río para lavado o aseo personal, actividades de jardinería en bosques, así como parámetros ambientales como precipitación, suelo húmedo en los alrededores de una casa, presencia de desechos orgánicos y ratas en los alrededores de una casa. Se ha determinado también relación directa de la enfermedad por contacto con animales infectados (estudio realizado en el sudeste asiático) (Bovet *et al*, 1999).

La complejidad del ciclo de vida de este patógeno implica la necesidad de un manejo epidemiológico que incluya la identificación y detección de la bacteria en varios niveles: animales reservorios, fuentes de agua y suelo. Este enfoque no solamente permitirá mantener un monitoreo más detallado de cualquier brote de la enfermedad, sino que además es una poderosa herramienta para la comprensión de la epidemiología y las rutas de contagio específicas en cada escenario donde se identifique la presencia de *Leptospira* (Haake, 2006).

1.2.2.1. Importancia del agua en la transmisión de la leptospirosis

Durante varias décadas se ha sabido que los miembros de este género bacteriano tienen la capacidad de supervivencia en fuentes de agua dulce, y que las mismas son claves en la transmisión de la leptospirosis en humanos (Henry & Johnson, 1978). En el caso de ríos o arroyos,

existen estudios que reportan aislamiento de *Leptospira* spp. mediante cultivo en medio de enriquecimiento EMJH (Henry & Johnson, 1978). Siendo estas fuentes de agua dulce un reservorio importante para la transmisión de la enfermedad, el análisis de aguas que son comúnmente utilizadas por poblaciones humanas es crucial para el entendimiento de la situación actual de esta enfermedad en el Ecuador, así como la epidemiología de la misma. Las capacidades de supervivencia de varias especies de *Leptospira* en fuentes de agua puede observarse experimentalmente, y confirmarse mediante análisis de genómica comparativa entre distintas especies de *Leptospira*. Se ha demostrado que *Leptospira interrogans*, la especie modelo de leptospira patógenas, presenta la capacidad de supervivencia en agua con concentraciones mínimas de nutrientes por tiempos determinados (Trueba *et al*, 2004). Adicionalmente, análisis de genómica comparativa entre *L. interrogans* y *L. biflexa* (especie ambiental) demuestra considerables similitudes en cuanto a la presencia de genes involucrados en supervivencia en el ambiente: mecanismos de transducción de señal que pueden ayudar en la detección de señales ambientales y genes de producción de biofilm que pueden estar involucrados en la colonización de nichos (Picardeau *et al*, 2008). Este último punto ya ha sido observado en modelos *in vitro* en especies patógenas (Barragán *et al*, 2011). Sin embargo, las dificultades de cultivo de las especies patógenas de este género a partir de muestras ambientales ha sido un factor limitante para su detección y monitoreo. Dichas limitaciones están relacionadas, entre otros factores, a la alta tasa de crecimiento de las especies saprófitas en relación a las especies patógenas, lo que genera un crecimiento desproporcional de ambos tipos en cultivos mixtos (como es el caso de cultivo de muestras ambientales). Adicionalmente, las similitudes morfológicas entre especies saprofitas y patogénicas, y el alto consumo de tiempo requerido para el proceso de cultivo (Ganoza *et al*, 2006) hacen de esta metodología difícil. Estos antecedentes llevan a proponer la detección de ácidos nucleicos de *Leptospira* como la metodología para determinar la presencia y ausencia del microorganismo en fuentes de agua y el uso de PCR a tiempo real (qRT-PCR) como herramienta de alta sensibilidad (Mérien *et al*, 1992) que permita cuantificar la cantidad del patógeno.

1.2.2.1. Distribución

La leptospirosis es considerada una enfermedad zoonótica de distribución global. Descripciones de sintomatología relacionada con infecciones por *Leptospira* han sido descritas históricamente en varias regiones, y el agente causal fue observado independientemente por grupos de Alemania y Japón en 1915 (Levett, 2001). La leptospirosis presenta prevalencias mayores en países de

regiones tropicales, particularmente en las regiones de América del Sur, el Caribe, el subcontinente de India y Oceanía, pudiendo observarse una menor prevalencia en Europa Oriental. Existen pocos reportes relacionados con países industrializados, en los cuales éstos corresponden normalmente a brotes iniciados por viajes a países de alto riesgo, y relacionado con actividades al aire libre (Pappas *et al*, 2007).

La distribución de la enfermedad, y en particular la incidencia de casos de infección, también depende en gran medida de algunos elementos estructurales y de paisaje de la zona en cuestión. Por ejemplo, el estudio de Vinetz *et al* (1996) realizado en la Amazonía peruana demostró la presencia de altas cantidades de *Leptospira* en aguas de río. Adicionalmente, otros reservorios urbanos como sistemas de drenaje de aguas abiertos han sido identificados como focos de *Leptospira* (Haake, 2006).

1.2.3. La leptospirosis en el Ecuador

El Ecuador se encuentra dentro de los países con mayor incidencia de leptospirosis a nivel global, con una incidencia anual de 11.6 casos por cada millón de personas (puesto no. 18 a nivel mundial) (Pappas *et al*, 2007). Los primeros casos de formas hemorrágicas de leptospirosis en Ecuador fueron reportados en Guayaquil por Hideyo Noguchi a principios del siglo XX (Noguchi, 1919). El brote más importante de leptospirosis humana identificado en el Ecuador, ocurrió durante el período invernal 1997-1998, cuando ciudades de la Costa (principalmente Guayas y Manabí) experimentaron un intenso ENSO (El Niño/Oscilación Sur). De este brote solo se tiene datos de la ciudad de Guayaquil y estuvo asociado con la hospitalización debido a formas severas de leptospirosis y una alta mortalidad (18/52) (OPS; CEPIS, 2003). Durante el invierno del año 2008, la provincia de Manabí mostró un incremento en la prevalencia de leptospirosis. Según los datos del antiguo Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical Leopoldo Izquieta Perez, ahora el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, la parroquia más afectada fue la de Calderón (Cantón Portoviejo) (La Hora, 2008).

1.3. La reacción en cadena de la polimerasa

Una de las herramientas esenciales en la biología molecular e ingeniería genética modernas, consiste en la amplificación (obtención de numerosas copias de una región de ADN) a través de la reacción en cadena de la polimerasa. Este procedimiento fue originalmente concebido por

Ghobind Korana y colegas, quienes propusieron al PCR como una estrategia para minimizar el trabajo de sintetizar genes químicamente. Sin embargo, las limitaciones técnicas de la época la hicieron un proceso poco práctico, y fue olvidado hasta que Kary Mullis y colegas, en 1985, independientemente propusieron esta técnica, y reportaron la amplificación de un gen de una sola copia de células de mamíferos utilizando una polimerasa I de fragmentos de Klenow aislada de *Escherichia coli*. Posteriormente, en 1988 se aisló la polimerasa termoresistente a partir del microorganismo extremófilo *Thermus aquaticus*, fue entonces cuando se obtuvo una reacción más robusta y utilizable en pruebas rutinarias de laboratorio (Sambrook & Russell, 2001).

El funcionamiento de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) se basa en el uso una serie de reactivos específicos para generar las copias de ADN del fragmento blanco. Los principales reactivos son una polimerasa termoestable (normalmente recombinante), cebadores (*primers* en inglés, oligonucleótidos de alrededor de 20 nucleótidos en longitud con complementariedad de secuencia con las regiones flanqueantes del fragmento que se busca amplificar) y deoxinucleosidos trifosfato (dNTPs, incorporados por la ADN polimerasa a la nueva cadena). La hibridación entre el *primer* y el ADN blanco ocurre a una temperatura específica, determinada por la secuencia de nucleótidos del primer. La reacción se genera en presencia de cationes divalentes, particularmente magnesio (Mg^{2+}), que sirven como cofactores para la enzima. Adicionalmente, la reacción requerirá soluciones tampón que mantengan un pH constante durante todo el proceso (Sambrook & Russell, 2001).

En base a la técnica original del PCR, se ha generado una serie de variaciones, las cuales cumplen con diferentes objetivos de investigación o para aplicaciones como monitoreo o diagnóstico. Dentro de estas variaciones, está el PCR cuantitativo (qPCR por sus siglas en inglés), el cual permite cuantificar el ADN o RNA obtenido a partir de una muestra (Liu & Baird, 2003). Otra es el PCR en tiempo real, una de las técnicas más utilizadas en la actualidad que utiliza moléculas fluorescentes que marcan al ADN mientras ocurre la amplificación, esto permite monitorear el procedimiento mientras ocurre. El PCR en tiempo real es también utilizado para cuantificar la cantidad de ADN inicial en una muestra determinada (qRT-PCR por sus siglas en inglés), éste se basa en la medición de fluorescencia durante la fase logarítmica de la reacción (Heid *et al*, 2008).

Para el qRT-PCR se puede utilizar sondas *Taqman* y SYBR Green I. La metodología más precisa, emplea sondas *Taqman*, estas son oligonucleótidos cortos con complementariedad con la secuencia blanco y están marcados con dos moléculas fluorescentes: un emisor de luz

(normalmente FAM, 6-carboxifluoresceína) y un atenuador (normalmente TAMRA, 6-carboxitetrametil-rodeína), el cual absorbe la energía fluorescente emitida por FAM a partir de un fenómeno de resonancia electrónica. De esta forma, la sonda completa no generará una señal detectable por el equipo donde se realice la reacción (puesto que la energía lumínica emitida por FAM será absorbida por TAMRA antes de que ésta llegue hacia el detector). Sin embargo, utilizando la función endonucleasa 5'-3' de la *Taq* polimerasa, la sonda hibridada al fragmento de ADN de interés será degradada, separando al fluoróforo FAM de su atenuador, y permitiendo la emisión de luz detectable por el equipo. De esta forma, mientras mayor cantidad de ADN produzca la reacción, mayor cantidad de sonda será degradada y como consecuencia, mayor fluorescencia será captada por el equipo (Heid *et al*, 2008).

El uso de SYBR Green I es una alternativa a las sondas *Taqman*. Éste es un agente intercalante que se une al ADN de cadena doble y emite una fluorescencia alrededor de 530nm (igual que FAM). El SYBR Green I se hibrida al producto de PCR formado durante la fase logarítmica de la reacción de amplificación y genera mayor señal a medida que la cantidad de producto aumenta. El uso de SYBR Green I permite el desarrollo de ensayos con un costo más accesible, aunque se sacrifique la especificidad (Botes *et al*, 2013). Para determinar la especificidad en una reacción con SYBR Green I se emplea una curva de fisión (T_m por sus siglas en inglés) en donde se analiza la temperatura a la cual las cadenas de ADN son separadas al incrementar gradualmente la temperatura. Con esto se logra separar todas las dobles hebras de ADN generando una disminución considerable de la fluorescencia (la temperatura a la que este fenómeno ocurra depende de las características termoquímicas del producto de PCR).

1.3.1. El PCR como herramienta para detectar microorganismos patógenos y sus aplicaciones en epidemiología

En años recientes, el uso del PCR se ha vuelto una herramienta útil en el diagnóstico de enfermedades de diversos tipos. La aplicación de distintos diseños experimentales permite una serie de aplicaciones, entre las cuales tenemos al *fingerprinting* molecular o genotipificación, identificación de especies, identificación de mutaciones puntuales (SNPs) y estudios epidemiológicos en patógenos de distintos tipos (Foxman, 2012). Por ejemplo, en enfermedades virales en donde la observación de lesiones características o el cultivo del virus solían ser la clave para el diagnóstico, el uso de PCR y qPCR se ha vuelto una herramienta alternativa y de alta

sensibilidad/especificidad. Actualmente enfermedades como citomegalovirus, herpes simplex, herpes zoster, Epstein-Barr, parvovirus B19, polyomaviruses, influenza y parainfluenza, adenovirus, enterovirus, hepatitis, papilomavirus y VIH son diagnosticadas exitosamente mediante esta metodología (Cobo, 2012).

1.3.2. Detección de patógenos en muestras ambientales y de agua mediante PCR

La detección de patógenos para análisis de riesgo y epidemiología de enfermedades como la leptospirosis utilizando fuentes de agua por métodos convencionales ha demostrado ser una metodología tediosa y complicada. Esto se debe principalmente al tiempo que requiere el cultivo o el aislamiento de los patógenos, o por el hecho de que muchos de estos microorganismos no son cultivables. Por esa razón, han surgido técnicas moleculares que permiten identificar patógenos simplemente mediante la detección de sus ácidos nucleicos. Si bien ésta metodología presenta la limitación de no poder distinguir la presencia de organismos vivos de muertos, esto no ha evitado que su uso sea cada vez más común para la caracterización de patógenos en diversos tipos de muestras ambientales (Botes *et al*, 2013).

Las aplicaciones del PCR se han ido ampliando más allá del diagnóstico. Es así como el uso del qRT-PCR para monitoreo de patógenos en el ambiente ha ido incrementando. Esta herramienta ha logrado sobrellevar dificultades como la contaminación de los cultivos al intentar aislar al patógeno entre miles de otras bacterias ambientales, o la no recuperación del mismo debido a las bajas concentraciones en la muestra (Botes *et al*, 2013). Sin olvidar que el PCR provee resultados en tiempos mucho menores que el cultivo microbiológico.

La detección de microorganismos en muestras ambientales a partir de PCR depende inicialmente en el protocolo de extracción de ADN a partir de dicha muestra, y luego de la reacción de PCR en sí. El qRT-PCR es considerado más sensible y rápido que el PCR convencional (un protocolo con SYBR Green I es reportado como 10 veces más sensible que un protocolo convencional de PCR) (Botes *et al*, 2013). Como consecuencia, ésta técnica es una alternativa atractiva para cuantificar ácidos nucleicos de una serie de patógenos en muestras ambientales. Sin embargo, el manejo de la extracción de ADN o RNA a partir de muestras ambientales es todavía un reto y requiere de procedimientos de filtración y limpieza de la muestra, previos a la extracción. Se ha reportado resultados satisfactorios con técnicas de extracción por lisis celular química, como las que utilizan ciertos kits comerciales, así como por protocolos de lisis mecánica (Botes *et al*, 2013).

Algunos microorganismos patógenos para el ser humano y otros animales (hongos, bacterias, parásitos y virus), son transmitidos a través del ambiente. En algunos casos el ciclo de vida del patógeno depende del ambiente en el que se encuentra, como puede ser el caso de algunas levaduras causantes de enfermedades encontradas en suelos de zonas tropicales (Mok *et al*, 1984). Este también es el caso de *Vibrio*, particularmente asociado con fuentes de agua salada o de estero (Kelly & Avery, 1980), así como de variantes de virus de influenza en ecosistemas donde habitan algunas especies de aves (Keeler *et al*, 2011).

En el caso de *Leptospira*, la importancia del monitoreo de fuentes de agua se basa principalmente en el ciclo de vida natural de la bacteria. Ya se ha mencionado la capacidad de supervivencia de la bacteria en fuentes de agua (Trueba *et al*, 2004; Ganoza *et al*, 2006), y la importancia que ésta presenta en el contagio de la enfermedad (Monahan *et al*, 2009; Arcilla *et al*, 2012; Chusri *et al*, 2012; Grambusch & Hoedebecke, 2012; Sopian *et al*, 2012; Dechet *et al*, 2012; Smith *et al*, 2012).

El presente proyecto presenta un protocolo estandarizado para la detección de especies patógenas e intermedias de *Leptospira* patógenas en muestras de agua de río. Con este fin, se determinó la metodología de recolección de muestras más eficiente, para obtener una cantidad de ADN suficiente para cada muestra. Posteriormente, se estableció un algoritmo para la detección de la bacteria en las muestras, con capacidad de discriminación entre especies patógenas intermedias y patógenas. Finalmente, mediante un análisis de secuencias de ADN, se logró determinar las especies patógenas presentes en cada muestra.

2. Objetivo General

El objetivo del presente estudio fue la estandarización un protocolo para la recolección de muestras de agua de río y detección de leptospiras patógenas mediante el uso de Real Time PCR.

3. Objetivos Específicos

- Estandarizar una metodología de recolección de agua de río a partir de la cual se pueda obtener ADN de *Leptospira*.
- Estandarizar un protocolo de PCR en Tiempo Real para la detección de *Leptospira* patógenas en muestras de agua de río.
- Determinar el límite de detección del protocolo de PCR en Tiempo Real estandarizado para la detección de *Leptospira* patógena en muestras de agua.

-Identificar las especies de *Leptospira* encontradas mediante el análisis de las secuencias de los productos de PCR del gen *lipL32*.

4. Área de estudio

Este estudio se enfocó en la identificación de especies de *Leptospira* en dos provincias del Ecuador: Esmeraldas y Manabí. Las muestras de Esmeraldas fueron tomadas durante los años 2007, 2008 y 2011 en zonas pobladas a lo largo del río Cayapas y sus afluentes, correspondientes al norte de la provincia (Borbón y ciudades/poblados cercanos). Los muestreos en la provincia de Manabí se centraron en varios ríos cercanos a la ciudad de Portoviejo, incluyendo al río Portoviejo, Río Chico y Río Calceta. Todas las muestras fueron tomadas exclusivamente de fuentes de agua dulce relacionadas con ríos, ya sean canales principales de ríos, afluentes o riachuelos secundarios.

5. Justificación

El Ecuador es un país que tiene una situación geográfica, climática y socioeconómica que lo hace propenso al desarrollo de epidemias de leptospirosis, particularmente en zonas rurales, dada la presencia de varios factores de riesgo relacionados con la transmisión de esta bacteria. La transmisión de la leptospirosis se encuentra relacionada con el contacto con fuentes de agua dulce y salobre. Son factores de riesgo la práctica de deportes acuáticos, contacto directo con animales y suelo contaminado, y situaciones ocupacionales propias del trabajo ganadero o veterinario (Vinetz *et al*, 1996). Es por eso que el monitoreo de las posibles fuentes de *Leptospira* spp. es una herramienta importante en la prevención y manejo de potenciales brotes de esta enfermedad.

El Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito ha establecido estudios previos en la presencia de *Leptospira* en el país, y ha estandarizado protocolos de detección e identificación de *Leptospira* spp. en muestras de animales (Baquero *et al*, 2010). También se ha realizado estudios sobre la biología básica de este microorganismo, particularmente en cuanto a las interacciones de la misma con otras especies bacterianas encontradas en agua y la dinámica de formación de biofilm de *Leptospira* en medios con limitaciones nutricionales (Barragán *et al*, 2011). El presente proyecto busca complementar dichos estudios, e implementar una herramienta que permita detectar e identificar especies patógenas de *Leptospira* en agua de ríos. Los resultados de este estudio son un aporte importante que permitirá expandir los conocimientos actuales sobre la epidemiología de la leptospirosis en el Ecuador. Estudios de detección de especies patógenas de *Leptospira* en el ambiente (agua y suelo) ya han sido realizados por otros grupos de investigación, sin embargo, en estos casos se aplicaron técnicas de secuenciación

considerablemente más caras (Ganoza *et al*, 2006), que son inalcanzables para estudios de monitoreo en nuestro país. Otros estudios se limitan a determinar la presencia o ausencia de especies patógenas sin discriminar entre especies (Vital-Brazil *et al*, 2010). Debido a esto, se considera importante desarrollar un método eficiente de recolección de muestras de agua que permita recuperar la mayor cantidad de *Leptospira* spp. a partir de agua de ríos. Adicionalmente es considerado que la identificación de este patógeno a nivel de especies (genomoespecies) es indispensable para relacionar la circulación de *Leptospira* en fuentes de agua con la enfermedad en humanos.

6. Materiales

6.1. Colección y recuperación de muestras de agua de río

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

6.2. Extracción de ADN

- Kit de extracción FastADN SPIN Kit for Soil (Qbiogene)
- Micro-perlas de silicio o *Silica beads*
- Buffer AE (Qiagen)
- Vortex (Labnet International, Inc.)
- BeadBeater (Biospec Products)
- Baño María (Sheldon MFG., Inc.)
- Microcentrifuga (Eppendorf)

- Tubos de 1.5mL (Axygen, Inc.)

6.3. Diseño y selección de primers

- Software para alineamiento múltiple MEGA5.0 (Tamura *et al*, ©1993-2011)
- Software en línea de análisis de oligonucleótidos OligoCalculator version 3.26 (Northwestern University, 1997-2010)
- Software de diseño de primers Primer3 v. 3.0.0 (GNU GPLv2)
- Secuencias de *Leptospira* obtenidas del Genbank (nr/nt)

6.4. 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)
- Termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer)
- Primers (Invitrogen)
- ADN extraído de muestras de agua

6.5. Reacciones de PCR en Tiempo Real

- Kit iQ SYBR Kit (BioRad)
- Suero de Albumina Bovina acetilado para biología molecular (BSA)
- Primers (Invitrogen)
- ADN extraído de muestras de agua
- Termociclador para qRT-PCR CFX96 (BioRad)

6.6. Secuenciamiento y análisis de secuencias

- Servicio provisto por la empresa Functional Biosciences (Wisconsin, EEUU)
- Software para alineamiento de secuencias MEGA5.0 (Tamura *et al*, ©1993-2011)
- Software en línea para lineamientos de secuencias contra bases de datos Basic Local Alignment Search Tool-BLAST (NCBI)

7. Métodos

7.1. Localidades

Las muestras analizadas en este proyecto corresponden a distintos ríos, riachuelos y otras fuentes de agua de las provincias de Esmeraldas (4 localidades, con un total de 13 sitios de recolección) y Manabí (4 localidades, con un total de 6 sitios de recolección), recolectadas entre Noviembre del 2007 por Jessica Prince y Julio del 2012 por Bernardo Gutiérrez. Los sitios de colecta se resumen en la Tabla 1.

7.2. Colección de muestras de agua de río y recuperación *Leptospira* spp.

Dos protocolos distintos fueron utilizados para la recolección de muestras de agua de río del campo: método de Ganoza (2006) y método de moore swab de Barrett *et al* (1980). Para ambos protocolos, las muestras fueron filtradas utilizando la metodología de Vein *et al* (2012). Todas las muestras de agua se tomaron de una profundidad no mayor a 10 cm de la superficie del flujo del río.

7.2.1. Método de Ganoza *et al* (2006) para recolección de muestras de agua

Para el primer protocolo, se recolectó un volumen de 50 mL de agua en un tubo cónico estéril (Axygen), para su posterior procesamiento. Estos tubos de agua fueron transportados a 4°C hasta el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito, para ser inmediatamente congeladas a -20°C en un periodo máximo de 10 horas posterior a su colección. Previo a la extracción de ADN, estas muestras fueron descongeladas y centrifugadas por 30 minutos a 6000 rpm, para la posterior eliminación del sobrenadante, resuspensión del pellet formado en el fondo del tubo y uso de este material concentrado para la extracción de ADN.

7.2.2. Método de Moore Swab de Barrett *et al* (1980) para recolección de muestras de agua

Para el segundo protocolo, se colocó un pedazo de algodón sintético de nylon estéril en el interior de un embudo de plástico, previamente limpiado con hipoclorito de sodio al 10%, y a través de éste se filtró 16 litros de agua de río recolectados con una jarra plástica. Una vez terminado el filtrado, el algodón de nylon se colocó en un tubo cónico estéril de 50 mL y se añadió 10 mL de agua del río para transportar el algodón de nylon en un medio húmedo. Todas las muestras se transportaron en hieleras con geles de hielo, manteniendo una temperatura aproximada de 4°C. Todas las muestras fueron congeladas a -20°C en un periodo máximo de 10 horas posterior a su recolección. Posteriormente, las muestras fueron descongeladas para extracción de ADN, y el algodón sintético de nylon fue sacudido dentro del tubo para liberar todas las células bacterianas atrapadas en esta matriz.

7.2.3. Protocolo de Vein *et al* (2012) para la filtración de muestras de agua

Para ambas metodologías de colección de muestras se siguió un paso de filtrado previo a la extracción de ADN, originalmente reportado por Vein *et al* (2012). Las muestras se filtraron a través de un filtro de nitrocelulosa de 0.45µm (Millipore Corporation), toda la noche por decantación. Los filtros fueron luego cortados en mitades, para ser sometidos al protocolo de extracción de ADN.

7.3. Extracción de ADN

La extracción de ADN de cada muestra se realizó utilizando uno de tres posibles protocolos. El ADN de las primeras muestras, recolectada entre Noviembre 2007 y Mayo 2008, fue extraído utilizando el kit QIAmp ADN Mini Kit (Qiagen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las muestras recolectadas posteriormente fueron extraídas a partir de un protocolo modificado utilizando el kit FastADN SPIN Kit for Soil (Qbiogene), siguiendo las recomendaciones del fabricante y añadiendo un paso de incubación en baño María a 55°C, previo al paso de centrifugado, para aumentar la tasa de recuperación del ADN. Un segundo protocolo, reportado por Vein *et al* (2012), fue probado, utilizando cuentas (beads) de silicio para generar la lisis mecánica de las células en la muestra. Un resumen de todos los protocolos de extracción de ADN utilizados basados en los distintos tipos de muestras recolectadas se presentan en la Figura 1.

7.4. Primers para la amplificación de especies patógenas de *Leptospira* a partir de muestras de agua y reacciones de PCR y qRT-PCR

7.4.1. Selección y diseño de primers

Como control positivo para identificación de presencia de ADN bacteriano en las muestras de agua, se utilizaron los primers 16SV3 (Tabla 2), que amplifican la región variable V3 de 193pb del gen que codifica para la subunidad 16s del ribosoma, común para todas las especies bacterianas (Muyzer *et al*, 1993).

Para la identificación de presencia de ácidos nucleicos de *Leptospira* en todas las muestras analizadas, se utilizaron los pares de primers AB y CD (Tabla 2), reportados por Mérien *et al* (1992). Estos pares de primers generan amplicones de 330pb y 289pb respectivamente, de una región del gen *rrs*.

Para la identificación de especies patógenas de *Leptospira* en muestras de agua, se utilizaron los primers que tenían como blanco a los genes *lip32* (proteína de membrana externa) y *secY* (subunidad de translocasa). El primer par de primers, reportados por Levett *et al* (2005), amplifican una región de 423pb del gen *lip32* (primers LipL32-270F y LipL32-692R). El segundo par de primers, publicados por Ahmed *et al* (2009), fueron degenerados en la base no.12 desde el extremo 3' el primer forward y en las bases no.8 y no.13 desde el extremo 3' para el primer reverse. Este proceso se realizó para aumentar la especificidad ante cepas específicas de *Leptospira* (primers SecYIVF(deg) y SecYIV(deg)). Los primers amplifican un fragmento de 202pb del gen *secY* (Tabla 2). Los primers modificados se diseñaron en base a un alineamiento múltiple realizado con varias accesiones del gen *secY* de varias especies de *Leptospira*. El alineamiento se realizó mediante el método de ClustalW, utilizando el programa MEGA5.0, y se los revisó para temperatura de hibridación y posible formación de estructuras secundarias con el software en línea OligoCalc (Northwestern University, EEUU, <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>). Los sitios de hibridación de los primers se confirmaron con el software en línea Primer3 (Massachusetts Institute of Technology, EEUU). Los mismos primers sin variación de secuencias, como se reportan por Ahmed *et al* (2009), también fueron probados como control.

7.4.2. Reacciones de PCR convencionales

Para todas las reacciones presentadas en esta sección, los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñidos con SYBR Safe (Invitrogen), corridos a 80V por un tiempo de 50 minutos. El tamaño de cada amplicón se determinó por comparación con una escalera molecular de 100pb (Axygen).

7.4.2.1. PCR convencional con primers 16SV3 (Muyzer *et al*, 1993)

Para la reacción de PCR convencional realizada con los primers 16SV3 (Tabla 2), se realizaron reacciones con un volumen final de 25 μ L, conteniendo buffer de reacción 1x, 1.5mM de MgCl₂ 200 μ M de dNTPs, 0.3 μ M de cada primer y 0.0125U/ μ L de polimerasa *Taq* Platinum (Invitrogen).

El protocolo de PCR para estos primers consistió de una denaturación inicial a 94°C por 4 minutos, seguido por 30 ciclos con denaturación a 94°C por 30 segundos, temperatura de hibridación de 65°C por 60 segundos, bajando la temperatura por 1°C cada segundo ciclo hasta llegar a 55°C, y una elongación a 72°C por 30 segundos, culminando con una extensión final a 72°C por 20 minutos (Muyzer *et al*, 1993).

7.4.2.2. PCR convencional con primers AB/CD (Mérien *et al*, 1992)

Para los juegos primers AB y CD (Tabla 2), se realizaron reacciones con un volumen final de 25 μ L, conteniendo buffer de reacción 1x, 2mM de MgCl₂ 200 μ M de dNTPs, 0.5 μ g/ μ L de BSA, 1 μ M de cada primer y 0.0125U/ μ L de polimerasa *Taq* Platinum (Invitrogen). Cada juego de primers, AB y CD, se corrió en reacciones separadas.

El protocolo para este PCR consistió en una denaturación inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos con denaturación a 94°C por 1 minuto, temperatura de hibridación de 63°C por 1 minuto y medio y una extensión a 72°C por 1 minuto. Finalmente se incorpora una extensión final a 72°C por 10 minutos.

7.4.2.3. PCR convencional con primers A-Inter/C-Inter

Los primers Inter fueron diseñados para funcionar en conjunto con los primers A y C, y amplificar una región del gen 16S rADN exclusivo para leptospiros intermedias (Tabla 2). El protocolo fue estandarizado por Jorge Chiriboga en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San

Francisco de Quito, siguiendo las mismas condiciones de PCR que los juegos de primers AB y CD, tanto en concentraciones de reactivos como en el programa de ciclado.

Las muestras fueron probadas con dos procedimientos de PCR: a partir de las muestras de agua y realizando un *nested* PCR. Para el *nested* PCR, la amplificación inicial fue realizada utilizando los primers AB y CD descritos previamente, y los amplicones fueron utilizados para generar una reacción de PCR con los primers A-Inter y C-Inter.

7.4.2.4. PCR convencional con primers secYIV (Ahmed *et al*, 2009)

Para los primers secYIVF(deg) y secYIV(deg) (Tabla 2), se realizaron reacciones con un volumen final de 25µL, conteniendo buffer de reacción 1x, 6mM de MgCl₂, 400µM de dNTPs, 0.4µM de cada primer y 0.0125U/µL de polimerasa *Taq* Platinum (Invitrogen).

El ciclado para este PCR consistió en una 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.

7.4.2.4.1. Límite inferior de detección con primers secYIV

Para determinar la cantidad mínima de detección de *Leptospira* en una muestra de agua, se realizaron diluciones seriales de cantidades conocidas de la bacteria. Para esto, se realizó un recuento directo en microscopio de campo oscuro con una cámara Petroff-Hausser, de un cultivo de *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo en medio EMJH líquido. Tras determinar la densidad de células bacterianas por volumen de medio de cultivo, se realizaron diluciones seriales del medio de cultivo en agua de una laguna artificial (Laguna de la USFQ-Cumbayá). Se obtuvieron concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 células/mL, en volúmenes finales de 4L. A partir de estos volúmenes, se realizaron extracciones siguiendo los protocolos previamente mencionados, y se realizaron pruebas con el primer que amplifica para el gen *secY*.

7.4.2.5. PCR convencional con primers LipL32

Para los primers LipL32-270F y LipL32-692R (Tabla 2), se realizaron reacciones con un volumen final de 25µL, conteniendo buffer de reacción 1x, 3mM de MgCl₂, 200µM de dNTPs, 0.05µM del

primer forward y 0.15 μ M del primer reverse y 0.0125U/ μ L de polimerasa *Taq* Platinum (Invitrogen).

El ciclado para este PCR consistió en una denaturación inicial a 95°C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos con denaturación a 95°C por 15 segundos, temperatura de hibridación de 67°C por 30 segundos y una extensión a 72°C por 40 segundos. Finalmente se incorporó un paso a 95°C por 30 segundos seguido de 30 segundos a 20°C.

7.4.2.5.1. Límite inferior de detección primers LipL32

Para determinar el límite inferior de detección de los primers LipL32 se utilizó el mismo procedimiento aplicado para los primers secYIV.

7.4.3. Reacciones de PCR en tiempo real

7.4.3.1. PCR en tiempo real con primers LipL32

Se corrieron PCRs en tiempo real para todas las muestras obtenidas en Manabí y para las muestras positivas para *Leptospira* (independientemente si eran patógenas, intermedias o saprofitas), para confirmar la presencia de cepas patógenas del microorganismo. La PCR en tiempo real para los primers LipL32-270F y LipL32-692R se realizó en un volumen total de 10 μ L que contenía 1x de iQ SYBR Green Supermix (Biorad), 0.05 μ M del primer forward y 0.15 μ M del primer reverse, y 3 μ L de ADN.

Las reacciones se corrieron en un termociclador CFX96 Real-Time System (BioRad), con el siguiente protocolo: denaturación inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 55 ciclos de denaturación a 95°C por 15 segundos, una temperatura de hibridación de 67°C por 30 segundos y una extensión a 72°C por 40 segundos. Posteriormente, se generó una denaturación total a 95°C por 30 segundos, una renaturación a 55°C por 30 segundos y una curva de fusión de 55°C a 95°C con incrementos de temperatura de 0.5°C y mediciones de fluorescencia cada 5 segundos.

7.5. Secuenciamiento de amplicones y análisis de secuencias

Las muestras positivas fueron reamplificadas utilizando los mismos protocolos aplicados para la amplificación en PCR convencional para el respectivo fragmento, y enviadas para su secuenciamiento a Functional Biosciences (Wisconsin, EEUU). Una vez obtenidos los archivos “.ab1” del secuenciador, se realizaron alineamientos en pares utilizando las secuencias del primer

forward y el primer reverse para cada muestra, utilizando el programa MEGA5.0 (Tamura *et al*, ©1993-2011). Una vez obtenidas las secuencias finales (curadas manualmente en base a los archivos .ab1), se procedió a realizar alineamientos con el programa Basic Local Alignment Search Tool (nucleotide BLAST, National Center for Biotechnology Information). Se compararon las secuencias obtenidas con accesiones en el Genbank. En base a estos resultados se logró determinar la identidad de los fragmentos secuenciados, utilizando al porcentaje de cobertura, porcentaje de similitud y valores E de cada alineamiento como parámetros para determinar el nivel de confianza de la identificación.

8. Resultados

8.1. Recuperación de ADN

Basado en la combinación de los distintos métodos para la recolección de muestras de agua, recuperación de células bacterianas totales a partir de centrifugado o filtrado, y con ambos protocolos de extracción de ADN, se logró recuperar cantidades similares de ADN total (concentraciones entre 20ng/μL y 40ng/μL), indiferentemente de la combinación de métodos utilizados.

Luego de realizada la extracción de ADN se procedió a amplificar las muestras con un control de amplificación que descarte la presencia de compuestos inhibitorios de la PCR en la muestra. Para esto se utilizó los primers 16SV3, los cuales amplifican una región variable del gen que codifica para la subunidad 16S del rARN. Se obtuvo amplificaciones positivas para ADN bacteriano en las extracciones realizadas con el método de recolección por Moore Swab y extracción con el kit (Qbiogene), o recolección directa y extracción con kit (Qbiogene). Sin embargo, las amplificaciones realizadas con los primers específicos para *Leptospira*, AB y CD, generaron amplificación exclusivamente en las muestras que fueron extraídas con kit (Qbiogene) y recolectadas con la metodología de Moore Swab, y no en las recolectadas a partir de centrifugación (Figura 2).

La evaluación de calidad del ADN de las muestras recolectadas en el 2008-2009 (extracción realizada con kit [Qiagen]), fue realizada previamente por Jessica Price en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

8.2. Detección de *Leptospira* en muestras de agua

Se utilizaron varias metodologías para la detección de cepas de varios tipos de *Leptospira* en las muestras de agua colectadas.

8.2.1. Identificación de especies patógenas

8.2.1.1. Primers lipL32

Se realizaron amplificaciones de prueba en PCR convencional utilizando controles positivos (Laboratorio de Microbiología, USFQ) de *Leptospira interrogans* serovares Lai e Icterohemorragiae y *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo, donde se obtuvo amplificaciones positivas, con una banda en el tamaño esperado de alrededor de 200pb.

Para el análisis de PCR en tiempo real, se analizaron un total de 46 muestras de ADN extraído a partir de muestras de agua, de los cuales 26 provenían de la provincia de Esmeraldas y 20 de la Provincia de Manabí. Se obtuvo un total de 9 muestras positivas, en donde 7 pertenecían a la provincia de Esmeraldas (R11 Nov, R12 Nov, R12 Dec, B1 Nov, B3 Nov, B2 AB y SD6 AB), y 2 a la Provincia de Manabí (Cald.2B-FAST y SA.2B-FAST). Estas muestras positivas fueron establecidas como tal mediante una curva de fisión (o *melting*) en donde se observó un pico en una temperatura entre 79°C y 85°C, similar a la encontrada en los controles.

8.2.1.1.1. Límite de detección de primers Lip32.

Para determinar el límite inferior de detección del PCR convencional, se realizó el PCR a partir de diluciones de concentraciones conocidas de *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. Estos resultados demostraron un límite inferior de detección de 10 células bacterianas por mL de agua de río utilizando el protocolo de Moore Swab (Figura 3), y 100 células bacterianas por mL de agua utilizando PCR en tiempo real (Figura 4).

8.2.1.2. Primers secYIV

Para determinar el uso de los primers secYIV(deg), se realizaron PCRs convencionales con estos primers, utilizando los mismos controles positivos que se mencionaron en el PCR convencional para lipL32. Este PCR generó una banda de alrededor de 400pb, lo cual coincide con el tamaño esperado (Figura 5).

Para el PCR en tiempo real, el protocolo para amplificación del gen *secY* a partir de los primers *secYIV* funcionó para la amplificación de controles positivos, obteniendo un Ct tardío (alrededor del ciclo 40) y un valor de Tm de 80°C. Esta amplificación exitosa fue obtenida esporádicamente en muestras de agua de Manabí y Esmeraldas, pero estos resultados no pudieron replicarse posteriormente.

8.2.1.2.1. Límite de detección

La misma metodología de determinación de límite de detección utilizada para *lipL32* fue utilizada para este PCR convencional, obteniéndose un límite de detección de 100 células/mL (Figura 3).

8.2.2. Detección de especies intermedias

8.2.2.1. Primers A-Intermedia y C-Intermedia (PCR convencional)

Los resultados para el PCR convencional utilizando primers forward A y C combinado con el primer reverse Inter generaron un total de 12 muestras positivas. De estas muestras, 7 correspondían a positivos intensos, mientras que otras 5 se clasificaron como positivos débiles (de acuerdo a la intensidad de la banda). De este total, la mayoría (7 muestras) provenían de Manabí (SA2A, SA2B, SA2, Cald.2, Pic.2B, Cald.2A y Calc.2B), mientras que solamente 5 muestras de Esmeraldas (R11Nov, R12Nov, R12Dec, SD6AB y B3Nov) generaron amplificaciones en este experimento (Figura 6).

En base a los resultados presentados, se volvieron a analizar las muestras de Manabí con una PCR anidada (*nested PCR*). En estos nuevos experimentos se encontró un total de 5 muestras positivas: 3 positivas con la combinación de primers A-Inter y 2 muestras positivas débiles con la combinación de primers C-Inter. Finalmente, se obtuvo un total de 8 muestras positivas para la provincia de Manabí, las muestras previamente mencionadas y SA2 (Tabla 3). Las muestras SA2A, Pic.2B y Calc.2B generaron amplificación con ambas combinaciones de primers, A-Inter y C-Inter.

8.3. Análisis de secuencias

8.2.2. Amplicones *lip32*

Del total de las 9 muestras positivas y enviadas para secuenciamiento, se obtuvo espectros de secuenciamiento claros únicamente para 5 muestras: B1Nov, B3Nov y R12Dec de Esmeraldas, y Cald.2B-FAST y SA.2B-FAST de Manabí (Figura 7a). Para las otras 4 muestras, se obtuvieron espectros poco claros, pero también fue posible obtener secuencias consenso. Los análisis de

alineamiento realizados en BLAST (NCBI) comparando con bases de datos de nucleótidos no redundantes (nt/nr) y optimizados para secuencias altamente similares, generaron resultados de identidad para cada una de las muestras. Dentro de las 5 muestras con espectros de secuenciamiento claro, las tres muestras de Esmeraldas presentaron identidades de 99% y 100% para B1Nov y B3Nov respectivamente (B1Nov presentaba dos nucleótidos menos en su extremo 3' por ruido presente en su archivo de secuenciamiento), para cepas de *Leptospira borgpetersenii*. Estas similitudes se generaron con cepas UPM, caracterizadas por la Universiti Putra Malaysia (los valores E obtenidos fueron de 0.00). En el caso de R12Dec, los mismos valores E de 0.00 fueron encontrados en alineamientos con varias cepas de *Leptospira borgpetersenii* (cepas UPM-KKB-15.2, UPM-R48, UPM-R44 y UPM-ISO9 entre otras). Para las dos muestras de Manabí, se obtuvo identidades máximas del 91% (con 100% de cobertura de secuencia) para dos cepas de *Leptospira noguchi* y varios registros de *Leptospira interrogans* para Cald.2B-FAST. En el caso de SA.2B-FAST, las identidades de 91% solamente se dieron para dos cepas de *Leptospira noguchi*, mientras que para los registros de *Leptospira interrogans* mencionadas previamente tuvieron un 90% de identidad (los valores E obtenidos fueron entre $2e-147$ y $8e-152$, con valores menores presentes en los resultados del alineamiento de SA.2B-FAST).

Para los cuatro secuenciamientos adicionales (muestras SD6AB, B2AB, R12Nov y R11Nov), se obtuvo archivos de secuenciamiento con picos mezclados (Figura 7b), en donde se observaba una predominancia de un set de picos frente a los otros, por lo que se procedió a corregir manualmente las secuencias. Para la muestra R12Nov, a pesar de la curación manual, no se consiguió obtener una secuencia consenso entre la secuencia obtenida del primer forward y la obtenida del reverse. Las otras tres muestras lograron ser analizadas, y los resultados del alineamiento en BLAST generó resultados con valores E menores, (entre $7e-62$ y $2e-05$). En la mayoría de casos los valores de confianza fueron aún altos. Para B2AB, se analizó un fragmento de 167 nucleótidos, donde el resultado del alineamiento en BLAST reveló una similitud del 86%-87% con varias secuencias de *Leptospira interrogans* (valores E entre $6e-31$ y $3e-29$). Para R11Nov, se analizó un fragmento de 153 nucleótidos y se obtuvo identidades del 92% con varias cepas de *Leptospira santarosai*, así como algunas accesiones de *Leptospira borgpetersenii* (valores E de $7e-12$ para todos los alineamientos con secuencias de *L. santarosai*). Para SD6AB, se analizó un fragmento de 313 nucleótidos, en donde se obtuvo similitudes de 85% con accesiones de *Leptospira interrogans*, *Leptospira kirschneri* y *Leptospira noguchi* (valores E entre $7e-62$ y $2e-58$).

Se analizó independientemente una región de 75 nucleótidos dentro de este fragmento, el cual logró tener homologías de un 90% con accesiones de *Leptospira interrogans*, con valores E más elevados por la longitud del fragmento (Tabla 4). Todas las secuencias se presentan en el Anexo 1.

9. Discusión

Para comprender la epidemiología de la leptospirosis, uno de los retos es el monitoreo de todos los reservorios y vías de contagio, incluyendo a fuentes de agua dulce donde la bacteria puede sobrevivir. Las fuentes de agua son importantes en la transmisión de la leptospirosis debido al constante contacto de las mismas con las poblaciones humanas. El presente estudio presenta el primer reporte a nivel nacional para la detección de *Leptospira* en fuentes de agua, enfocándose en especies patógenas e intermedias, las cuales conforman los grupos más relevantes para la salud pública. La necesidad de detectar especies de patogenicidad intermedia en agua radica en el reciente hallazgo de la presencia de estas especies en muestras humanas tanto en el Ecuador (Chiriboga, 2013) como en Perú (Ganoza *et al*, 2006). Por esa razón, resultados como los presentados en el presente estudio proveen una mejor idea sobre la dinámica de *Leptospira* en agua de ríos ecuatorianos.

En la literatura en general, existen numerosos reportes para la detección de *Leptospira* en muestras clínicas (Mérien *et al*, 1992; Gravekamp *et al*, 1993; Cheema *et al*, 2007; Ahmed *et al*, 2009; Ganoza *et al*, 2010; Bourhy *et al*, 2011), veterinarias (León *et al*, 2006; Baquero *et al*, 2010), e incluso muestras ambientales, ya sea por cultivo (Henry & Johnson, 1978) o estrategias de análisis de ácidos nucleicos (Ganoza *et al*, 2006; Magalhães Vital-Brazil *et al*, 2010; Viau & Boehm, 2011; Vein *et al*, 2012). De los estudios en muestras de agua, la mayoría se centran en fuentes de agua sin flujo (como lagos) o con altas cantidades de sedimentos (charcos, orilla de ríos, o alcantarillas en zonas urbanas), pero la detección en agua de ríos o riachuelos corrientosos ha sido poco común, con solo un reporte publicado (Viau & Boehm, 2011). Las metodologías de recolección propuestas en ese y otros estudios no presentan intentos de concentración de la cantidad de células bacterianas, por lo que el presente reporte propone una metodología alternativa, en la cual se utilizan pasos previos de filtrado del agua recolectada y microfiltrado de cada muestra, para recuperar una mayor cantidad de células. Los resultados demuestran una amplificación más confiable en las muestras obtenidas mediante filtrado, al compararlas con un protocolo de extracción en el cual las muestras solo son concentradas por centrifugación, como el

utilizado por Viau & Boehm (2011). Esto sugeriría que la aplicación de la metodología propuesta, en combinación con el uso de un kit comercial de extracción (Qbiogene), son adecuados para la recuperación de ADN de *Leptospira*.

El presente estudio aplica técnicas moleculares diferenciales para caracterizar los tipos de *Leptospira* presentes en cada muestra, con lo que es posible establecer la presencia de especies patógenas o intermedias en cada localidad muestreada. El enfoque escogido se basa en el uso de un algoritmo selectivo que utiliza una combinación de 4 sets de primers (Figura 8) para este propósito. Los dos primers iniciales, 16SV3f y 16SV3r, sirven como control de extracción de ADN y para descartar la posibilidad de falsos negativos. Los siguientes primers, los pares AB y CD, sirven para discriminar muestras que no contienen ningún tipo de *Leptospira*. Posteriormente, el uso de una reacción específica para especies patógenas con primers previamente reportados (Levett *et al*, 2005) en conjunto con una reacción específica para especies intermedias, originalmente diseñado para el monitoreo de muestras clínicas (Chiriboga, 2013), ayudaron a la determinación de los tipos de bacteria presentes en cada muestra. Si bien el algoritmo en si no es suficiente para una caracterización completa de cada muestra de agua, presenta la ventaja adicional de sugerir la posibilidad de circulación simultánea de varios tipos de bacteria en la misma muestra. Este fenómeno pudo ser observado en seis muestras analizadas, lo que sugiere que en ambas provincias (Manabí y Esmeraldas) podría existir esa circulación simultánea de varios tipos de *Leptospira*. Del algoritmo original, se excluyó el uso de los primers SecYIV, al no poder generar amplificaciones con éstos.

La capacidad de aplicar una metodología para detección de especies patógenas e intermedias de *Leptospira* en muestras de agua a nivel local es de suma importancia para prevenir brotes de la enfermedad en zonas de alta prevalencia. Los ríos en algunas de las zonas rurales e incluso urbanas que se analizaron son utilizados como fuente de agua para cocina, para lavado de ropa y aseo personal, e incluso para actividades recreativas. Es posible que los brotes en estas zonas tengan una relación cercana con la actividad de la bacteria en estos ríos, la cual a su vez puede estar relacionada con factores bióticos y abióticos en los ríos. Uno de estos factores puede ser la tasa de precipitación, la cual determinaría el flujo del río y la cantidad de nutrientes presentes en el mismo. Este fenómeno meteorológico podría también relacionarse con la estacionalidad de estos brotes de leptospirosis. Un monitoreo eficiente de las fuentes de agua permitiría establecer

el nivel de riesgo que presentan los ríos en el contagio de la enfermedad, y brindarían la posibilidad de estudios epidemiológicos más profundos.

Además del análisis a partir del algoritmo propuesto, el secuenciamiento de los fragmentos del gen *lip32* fue útil para determinar las especies presentes en cada muestra positiva. La capacidad de analizar las secuencias se vio limitada por la presencia de ciertos archivos de secuenciamiento con picos mezclados. Esto puede ser un indicador de la presencia de varios fragmentos homólogos distintos (Binladen *et al*, 2007), correspondientes a varias especies distintas en cada muestra. También podría deberse a una posible circulación simultánea de más de una especie patógena por muestra, como sugieren los resultados de circulación simultánea de especies patógenas e intermedias. Esta posibilidad de presencia de varias especies podría también verse reflejada en la baja sensibilidad de la técnica. Al establecer la sensibilidad en 100 células/mL, la reacción posiblemente genera cantidades de amplicón correspondientes a las especies más prevalentes por muestra (por lo que esta técnica también presentaría problemas para realizar cuantificaciones de la bacteria en cada muestra). Este fenómeno podría estudiarse únicamente mediante técnicas moleculares, dadas las dificultades del co-cultivo de especies patógenas con saprófitas (Henry & Johnson, 1978).

Sin embargo, fue posible establecer posibles especies presentes en cada una de las muestras, de las cuales una de las más prevalentes fue *Leptospira borgpetersenii*. Este hallazgo es interesante, pues esta especie no posee genes de supervivencia en el ambiente, presentando un genoma muy reducido (Bulach *et al*, 2006). Esto sugeriría que la presencia de esta especie en las muestras corresponde a una contaminación reciente con orina animal (probablemente ganado bovino o ratas), implicando además una relación cercana entre animales de la zona con la circulación de especies específicas en cada río, un fenómeno ampliamente documentado (Ganoza *et al*, 2006; Levett, 2001). Otra de las especies encontradas fue *Leptospira interrogans*, la cual tiene una distribución más amplia en animales y de la cual se cree puede sobrevivir en fuentes de agua gracias a su capacidad de producir biofilm (Trueba *et al*, 2004).

Un enfoque alternativo que permitiría obtener mayor cantidad de información de cada muestra puede basarse en el uso de técnicas de secuenciamiento de última generación, basado en plataformas de pirosecuenciamiento como el 454 (Life Sciences). Estas estrategias, basadas en una metodología de PCR de emulsión (emPCR) tienen la facultad de poder analizar múltiples fragmentos presentes en una muestra de forma diferencial y evitando el tener que recurrir a un

paso previo de clonación (Binladen *et al*, 2007), de tal manera que sea posible diferenciar si una misma reacción de PCR genera fragmentos de múltiples microorganismos. La aplicación de esta técnica en muestras de agua brindaría la ventaja adicional de detectar varias especies de *Leptospira* presentes en una misma muestra, además de caracterizar la microbiota acompañante. El uso de esta plataforma para detección de especies y caracterización de microbiota en fuentes de agua ya ha sido reportada (Ficetola *et al*, 2008; Sogin *et al*, 2006).

Los resultados globales del presente estudio indican la circulación de especies patógenas e intermedias de *Leptospira* en ríos de dos provincias de la costa ecuatoriana, lo cual sugiere que estas fuentes de agua podrían ser parte importante de las rutas de contagio de la leptospirosis. La dinámica de este género en fuentes de agua es un tema aún en investigación, donde parece haber interacciones del microorganismo con factores abióticos (i.e. factores climáticos) (Viau & Boehm, 2011), así como con la presencia de otros microorganismos (Barragán *et al*, 2011). La relación con el factor climático también podría estar cercanamente relacionada con la presencia de nutrientes en el medio. Esto podría influir particularmente en la presencia de leptospiras de vida libre en el agua, en comparación con células bacterianas presentes en biofilm. Estas leptospiras en biofilm podrían localizarse predominantemente en elementos del fondo de la trinchera del río como partículas de suelo y rocas. Las interacciones de *Leptospira* en biofilm con la presencia de nutrientes en su medio ya han sido estudiadas en modelos *in vitro* (Trueba *et al*, 2004), pero la influencia de estos fenómenos en un ambiente natural podría generar nuevos hallazgos.

Este es el primer reporte de detección de *Leptospira* en muestras de agua en el Ecuador, y mediante estos análisis se puede establecer un marco bajo el cual, a largo plazo, se pueden realizar monitoreos de ríos en zonas con alta prevalencia de leptospirosis, e incluso se pueden agregar estrategias adicionales como la cuantificación de ácidos nucleicos mediante PCR en tiempo real, para obtener una imagen más clara respecto a las dinámicas de poblaciones de distintos tipos de leptospiras en zonas determinadas. Por otra parte, una caracterización más detallada de estas muestras puede lograrse con enfoques más eficientes de secuenciamiento. El uso de una metodología de clonación de productos de PCR previo a su secuenciamiento, o el uso de técnicas de pirosecuenciamiento combinado con PCR de emulsión, podrían asistir en la caracterización la microbiota total de las muestras de agua.

10. Conclusiones

- Utilizando una combinación de primers y dos estrategias distintas de PCR, el presente estudio logró identificar, en muestras de agua de río, la presencia de leptospiras mediante la recuperación de sus ácidos nucleicos y el análisis de los mismos.
- Adicionalmente, fue posible determinar la presencia de especies patógenas e intermedias en estas muestras, con lo que se obtiene información adicional que no ha sido analizada previamente, respecto a la presencia de ciertos tipos determinados de leptospiras.
- En cuanto a la metodología de recolección de muestras y recuperación de ADN, fue posible determinar el protocolo más eficiente, que es una combinación de una metodología de recolección de *moore swab*, combinado con el uso de filtros de nitrocelulosa de 0.45 μ m para una filtración previa a la extracción de ADN, y el uso de un kit comercial para la extracción de ADN.
- Dentro de las técnicas moleculares utilizadas, se logró adaptar protocolos con 4 sets de primers distintos para determinar la presencia de ADN bacteriano viable, ADN de *Leptospira*, y discriminar entre especies patógenas e intermedias.
- Adicionalmente, el secuenciamiento de las muestras positivas para los primers LipL32 permitió determinar las especies presentes en 8 muestras, lo que brinda información adicional sobre las localidades estudiadas, y las posibles fuentes de donde provienen las bacterias presentes en éstas.

11. Recomendaciones

- Optimizar el proceso de extracción utilizando filtros de nitrocelulosa de 0.22 μ m para la recuperación de células bacterianas, mediante el uso de bombas de vacío con mayor potencia. Otra alternativa sería el uso de técnicas de filtración distintas, tales como filtraciones por fibra hueca o flujo tangencial, utilizadas previamente en la detección de patógenos en agua (Botes *et al*, 2013).
- Realizar pruebas con un kit específico para muestras de agua, como el kit MoBioPowerWater® ADN kit (MoBio Laboratories), como se reporta por Viau & Boehm (2011), podría incrementar la cantidad y calidad del ADN recuperado.
- Se podría realizar una cuantificación relativa o absoluta de la cantidad de bacteria presente originalmente en las muestras de agua utilizando reacciones de qRT-PCR.

- En base a un protocolo de cuantificación, realizar muestreos durante distintas épocas del año, particularmente basado en la pluviosidad durante cada época. Esta información agregaría el valor adicional de poder determinar meses de riesgo con mayores probabilidades de contagio por vías acuáticas.
- Desarrollar un protocolo para la secuenciación de genes con mayor variabilidad interna, como pueden ser *secY* o *gyrB*, los cuales podrían presentar una mayor eficiencia en reconocimiento de especies e incluso clonalidad de genotipos circulantes.
- Comparar resultados de análisis de agua con los encontrados en muestras clínicas de casos en las mismas localidades, para tener una idea más clara de la epidemiología de esta enfermedad a nivel local.
- Trabajar en el diseño de primers alternos con mayor especificidad para la detección de *Leptospira* intermedia en muestras de agua.
- Utilizar un enfoque de pirosecuenciamiento en base a PCR de emulsión para lograr una caracterización completa de las muestras de agua, y determinar la posible co-circulación de varias especies de *Leptospira* en una misma muestra.

12. Referencias

- Ahmed, N, Devi, SM, Valverde, MA, Vijayacha, P, Machang'u, RS, Ellis, WA, Hartskeerl, RA. (2006). Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 5(1): 28.
- Ahmed, A, Engelberts, FM, Boer, KR, Ahmed, N, Hartskeerl, RA. (2009). Development and Validation of a Real-Time PCR for Detection of Pathogenic *Leptospira* Species in Clinical Materials. *PLoS One* 4(9):e7093.
- Ahmed, A, Thaipadungpanit, J, Boonslip, S, Wuthiekanun, V, Nalam, K, Spratt, BG, Aanensen, DM, Smythe, LD, Ahmed, N, Feil, EJ, Hartskeerl, RA, Peacock, SJ. (2011). *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5(11): e1374.
- Arcilla, M, Wismans, PJ, van Beek-Nieuwland, Y, Genderen, PJ. (2012). Severe leptospirosis in a Dutch traveler returning from the Dominican Republic, October 2011. *Euro Surveill.* 17(13): 20134.
- Baquero, MI, López, N, Mejía, ME, Trueba, G. (2010). Evaluation of a Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Leptospirosis in Cattle. *The Open Veterinary Science Journal* 4: 31-35.
- Barragán, V, Mejía, ME, Trávez, A, Zapata, S, Hartskeerl, RA, Haake, DA, Trueba, GA. (2011). *Current Microbiology* 62: 1802-1806.
- Barret, TJ, Blake, PA, Morris, GK, Puhr, ND, Bradford, HB, Wells, JG. (1980). Use of Moore Swabs for Isolating *Vibrio cholera* from Sewage. *Journal of Clinical Microbiology* 11(4): 385-388.
- Binladen, J, Gilbert, MTP, Bollback, JP, Panitz, F, Bandixen, C, Nielsen, R, Willerslev, E. (2007). The Use of Coded PCR Primers Enables High-Throughput Sequencing of Multiple Homolog Amplification Products by 454 Parallel Sequencing. *PLoS One* 2(2): e197.
- Botes, M, Kwaadsteniet, M, Cloete, TE. (2013). Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water. *Anal Bioanal Chem* 405: 91-108.
- Bourhy, P, Bremont, S, Zinini, F, Giry, C, Picardeau, M. (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* 49(6): 2154.

- Bovet, P, Yersin, C, Merien, F, Davis, CE, Perolat, P. (1999). Factors associated with clinical leptospirosis: a population-based case-control study in the Seychelles (Indian Ocean). *International Journal of Epidemiology* 28: 583-590.
- Bulach, DM, Zuerner, RL, Wilson, P, Seemann, T, McGrath, A, Cullen, PA, Davis, J, Johnson, M, Kuczek, E, Alt, DP, Peterson-Burch, B, Coppel, RL, Rood, JI, Davies, JK, Adler, B. (2006). Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(39): 14560-14565.
- Cheema, PS, Srivastava, SK, Amutha, R, Singh, S, Sandey, M. (2007). Detection of pathogenic leptospires in animals by PCR based on *lipL21* and *lipL32* genes. *Indian Journal of Experimental Biology* 45: 568-573.
- Chiriboga, Jorge. (2013). Detección de especies de *Leptospira* en sueros humanos. Tesis requisito para la obtención del título de Ingeniero en Procesos Biotecnológicos. Universidad San Francisco de Quito.
- Chusri, S, Sritrairatchai, S, Hortiwahul, T, Charoenmak, B, Silpapojakul, K. (2012). Leptospirosis among river water rafters in Satoon, southern Thailand. *J. Med. Assoc. Thai.* 95(7): 874-877.
- Cobo, F. (2012). Application of Molecular Diagnostic Techniques for Viral Testing. *The Open Virology Journal* 6: 104-114.
- Dechet, AM, Parsons, M, Rambaran, M, Mohamed-Rambaran, P, Florendo-Cumbermack, A, Persaud, S, Baboolal, S, Ari, MD, Shadomy, SV, Zaki, SR, Paddock, CD, Clark, TA, Harris, L, Lyon, D, Mintz, ED. (2012). Leptospirosis outbreak following severe flooding: a rapid assessment and mass prophylaxis campaign; Guyana, January-February 2005. *PLoS One* 7(7): e39672.
- Dungan, RS, Klein, M, Leyten, AB. (2012). Quantification of Bacterial Indicators and Zoonotic Pathogens in Dairy Wastewater Ponds. *Applied and Environmental Microbiology* 78(22): 8089-8095.
- Ellis, T, Imrie, A, Katz, AR, Effler, PV. (2008). Underrecognition of Leptospirosis During a Dengue Fever Outbreak in Hawaii, 2001-2002. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 8(4): 541-547.
- Ficetola, GF, Milaud, C, Pompanon, F, Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* 4: 423-425.

- Flannery, B, Pereira, MM, de Freitas Velloso, L, de Castro Carvalho, C, Góes de Codes, L, de Saboia Orrico, G, Ribeiro Dourado, CM, Riley, LW, Reis, MG, Ko, AI. (2001). Referral pattern of leptospirosis cases during a large urban epidemic of dengue. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65(5): 657-663.
- Foxman, B. (2012). *Molecular Tools and Infectious Disease Epidemiology*. Elsevier-Academic Press. Londres, Inglaterra.
- Ganoza, CA, Matthias, MA, Collins-Richards, D, Brouwer, KC, Cunningham, CB, Segura, ER, Gilman, RH, Gotuzzo, E, Vinetz, JM. (2006). Determining Risk for Severe Leptospirosis by Molecular Analysis of Environmental Surface Waters for Pathogenic *Leptospira*. *PLoS Medicine* 3(8): e308.
- Ganoza, CA, Matthias, MA, Saito, M, Cespedes, M, Gotuzzo, E, Vinetz, JM. (2010). Asymptomatic Renal Colonization of Humans in the Peruvian Amazon by *Leptospira*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4(2): e612.
- Gerba, CP. (2000). Assessment of Enteric Pathogen Shedding by Bathers during Recreational Activity and its Impact on Water Quality. *Quantitative Microbiology* 2:55-68.
- Goyal, SM, Adams, WN, O'Malley, ML, Lear, DW. (1984). Human Pathogenic Viruses at Sewage Sludge Disposal Sites in the Middle Atlantic Region. *Applied and Environmental Microbiology* 48(4): 758-763.
- Grambusch, D, Hoedebecke, KL. (2012). Unforeseen risk: leptospirosis and the U.S. Special Operations community. *J. Spec. Oper. Med.* 12(3): 36-42.
- Gravekamp, C, Van de Kemp, H, Franzen, M, Carrington, D, Schoone, GJ, Van Eys, GJJM, Everard, COR, Hartskeerl, RA, Terpstra, WJ. (1993). Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *Journal of General Microbiology* 139: 1691-1700.
- Haake, D. (2006). Molecular Epidemiology of Leptospirosis in the Amazon. *PLoS Medicine* 3(8): e302.
- Heid, CA, Stevens, J, Livak, K, Williams, PM. (2008). Real Time Quantitative PCR. *Genome Research* 6: 986-994.
- Helmerhorst, HJF, van Tol, EN, Tuinman, PR, de Vries, PJ, Hartskeerl, RA, Grobusch, MP, Hovius, JW. (2012). Severe pulmonary manifestation of leptospirosis. *The Netherlands Journal of Medicine* 70(5): 215-221.

- Henry, RA, Johnson, RC. (1978). Distribution of the Genus *Leptospira* in Soil and Water. *Applied and Environmental Microbiology* 35(3): 492-499.
- Huitema, SW, Pal, TM, Groothoff, JW. (1989). Milker's fever, an occupational disease on the increase. *Ned Tijdschr Geneesk* 133: 1939-41.
- Keeler, SP, Berghaus, RD, Stallknecht, DE. (2012). Persistence of Low Pathogenic Avian Influenza Viruses in Filtered Surface Water from Waterfowl Habitats in Georgia, USA. *Journal of Wildlife Diseases* 48(4): 999-1009.
- Kelly, MT, Avery, DM. (1980). Lactose-Positive *Vibrio* in Seawater: a Cause of Pneumonia and Septicemia in a Drowning Victim. *Journal of Clinical Microbiology* 11(3): 278-280.
- Ko, AI, Goarant, C, Picardeau, M. (2009). *Leptospira*: The Dawn of the Molecular Genetics Era for an Emerging Zoonotic Pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7(10): 736-747
- León, A, Pronost, S, Tapprest, J, Foucher, N, Blanchard, B, André-Fontaine, G, Laugier, C, Fortier, G, Leclercq, R. (2006). Identification of pathogenic *Leptospira* strains in tissues of a premature foal by use of polymerase chain reaction analysis. *J Vet Diagn Invest* 18: 218-221.
- Levett, PN. (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*: 296-326.
- Levett, PN, Morey, RE, Galloway, RL, Turner, DE, Steigerwalt, AG, Mayer, LW. (2005). Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *Journal of Medical Microbiology* 54: 45-49.
- Levett, PN, Smythe, L. (2008). International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of Leptospiraceae. Minutes of the closed meeting, 18 September 2007, Quito, Ecuador. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 1048–1050.
- Limmathurotsaku, D, Turner, EL, Wuthiekanun, V, Thaipadungpanit, J, Supultamongkol, Y, Chierakul, W, Smythe, LD, Day, NPJ, Cooper, B, Peacock, S. (2012). Fool's Gold: Why Imperfect Reference Tests Are Undermining the Evaluation of Novel Diagnostics: A Reevaluation of 5 Diagnostic Tests for Leptospirosis. *Clinical Infectious Diseases* 55(3): 322-331.
- Liu, X, Baird, V. (2003). Differential Expression of Genes Regulated in Response to Drought or Salinity Stress in Sunflower. *Crop Science* 43: 678-687.
- Magalhães Vital-Brazil, J, Teruszkin-Balassiano, I, Sutter de Oliviera, F, Dias de Souza Costa, A, Hillen, L, Pereira, MM. (2010). Multiplex PCR-based detection of *Leptospira* in

environmental water samples obtained from a slum settlement. MemInstOswaldo Cruz 105(3): 353-355.

- Matthias, MA, Ricaldi, JN, Cespedes, M, Díaz, MM, Galloway, RL, Saito, M, Steigerwalt, AG, Patra, KP, Vidal Ore, C, Gotuzzo, E, Gilman, RH, Levett, PN, Vinetz, JM. (2008). Human Leptospirosis Caused by a New, Antigenically Unique *Leptospira* Associated with a *Rattus* Species Reservoir in the Peruvian Amazon. PLoS Neglected Tropical Diseases 2(4): e213.
- Mérien, 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.
- Mok, WY, Luizão, RCC, Barreto da Silva, MS, Teixeira, MF, Muniz, EG. (1984). Ecology of Pathogenic Yeasts in Amazonian Soil. Applied and Environmental Microbiology 47(2): 390-394.
- Monahan, AM, Miller, IS, Nally, JE. (2009). Leptospirosis: risks during recreational activities. J. Appl. Microbiol. 107(3): 707-716.
- Muyzer, G, de Waal, EC, Uitterlinden, AG. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology 59(3): 695.
- N/A. (2008, 28 de Mayo). Leptospirosis incontrolable. *La Hora*. Recuperado de http://www.lahora.com.ec/index.php/noticias/show/726776/-1/Leptospirosis_incontrolable.html#.UVuRn6KQWSp.
- Nabity, SA, Ribeiro, GS, Lessa Aquino, C, Takahashi, D, Oliveira Damião, A, Gonçalves, AHO, Miranda-Filho, DB, Greenwald, R, Esfandiari, J, Lyashenko, KP, Reis, MG, Madeiros, MA, Ko, AI. (2012). Accuracy of a Dual Path Platform (DPP) Assay for the Rapid Point-of-Care Diagnosis of Human Leptospirosis.
- Noble, RT, Blackwood, AD, Griffith, JF, McGee, CD, Weisberg, SB. (2010). Comparison of Rapid Quantitative PCR-Based and Conventional Culture-Based Methods for Enumeration of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in Recreational Waters. Applied and Environmental Microbiology 76(22): 7437-7443.
- OPS; CEPIS. Impacto del fenómeno del niño en la infraestructura de agua y alcantarillado : La experiencia del Ecuador en 1997-1998. Lima; OPS, 2003, 81 p. (Serie Salud Ambiental y Desastres, 3).

- Pappas, G, Papadimitriou, P, Siozopoulou, V, Christou, L, Akritidis, N. (2007). The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *International Journal of Infectious Diseases* 12: 351-357.
- Perolat, P, Chappel, RJ, Adler, B, Baranton, G, Bulacj, DM, Billingham, ML, Letocart, M, Merien, F, Serrano, S. (1998). *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. *International Journal of Systemic Bacteriology* 48: 851-858.
- Picardeau, M, Bulach, DM, Bouchier, C, Zuerner, RL, Zidane, N, Wilson, PJ, Creno, S, Kuczek, ES, Bommezzadri, S, Davis, JC, McGrath, A, Johnson, MJ, Boursaux-Eude, C, Seemann, T, Rouy, Z, Coppel, RL, Rood, JI, Lajus, A, Davies, JK, Médigue, C, Adler, B. (2008). Genome Sequence of the Saprophyte *Leptospira biflexa* Provides Insights into the Evolution of *Leptospira* and Pathogenesis of Leptospirosis. *PLoS One* 3(2): e1607.
- Ristow, P, Bourhy, P, Kerneis, S, Schmitt, C, Prevost, MC, Lilenbaum, W, Picardeau, M. (2008). Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiology* 154: 1309-1317.
- Sambrook, J, Russell, DW. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Tercera Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring, New York, EEUU.
- Sopian, M, Khair, MT, How, SH, Rajalingam, R, Sahhir, K, Norazah, A, Khebir, V, Jamalludin, AR. (2012). Outbreak of melioidosis and leptospirosis co-infection following a rescue operation. *Med. J. Malaysia* 67(3): 293-297.
- Sartori, FG, Leandro, LF, Montanari, LB, Mendes de Souza, MG, Pires, RH, Sato, DN, Fujimori Leite, CQ, de Andrade Prince, K, Comes Martins, CH. (2013). Isolation and Identification of Environmental Mycobacteria in the Waters of a Hemodialysis Center. *Current Microbiology*: 1-5.
- Shi Jun, L, Cui Cai, Z, Xiu Wen, L, Ke Cheng, T, GuangPeng, T, Ding Ming, W, Ying, L, Yi Xin, N, XiuGao, J. (2012). Molecular Typing of *Leptospira interrogans* Strains Isolated from *Rattustanezumi* in Guizhou Province, Southwest of China. *Biomed Environ Sci* 25(5): 542-548.
- Smith, JK, Young, MM, Wilson, KL, Craig, SB. (2012). Leptospirosis following a major flood in Central Queensland, Australia. *Epidemiol. Infect.* Mayo 25: 1-6.
- Sogin, ML, Morrison, HG, Huber, JA, Welch, DM, Huse, SM, Neal, PR, Arrleta, JM, Hernd, GJ. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the unexplored "rare biosphere". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(32): 12115-12120.

- Trueba, G, Zapata, S, Madrid, K, Cullen, P, Haake, D. (2004). Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *International Microbiology* 7:35-40.
- Turingan, RS, Thomann, HU, Zolotova, A, Tan, E, Selden, R. (2013). Rapid Focused Sequencing : A Multiplexed Assay for Simultaneous Detection and Strain Typing of *Bacillus anthracis*, *Francisellatularensis*, and *Yersinia pestis*. *PLoSOne* 8(2): e56093.
- Turner, LH. (1969). Leptospirosis. *British Medical Journal* 1: 231-235.
- Utzinger, J, Becker, SL, Knopp, S, Blum, J, Neumayr, AL, Keiser, J, Hatz, CF. (2012). Neglected tropical diseases: diagnosis, clinical management, treatment and control. *Swiss Medical Weekly* 142: w13727.
- Vein, J, Perrin, A, Berny, PJ, Benoit, E, Leblond, A, Kodjo, A. (2012). Adaptation of a real-time PCR method for the detection and quantification of pathogenic leptospires in environmental water. *Can. J. Microbiol.* 58: 828-835.
- Viau, EJ, Boehm, AB. (2011). Quantitative PCR-based detection of pathogenic *Leptospira* in Hawai'ian coastal streams. *Journal of Water and Health* 9(4): 637-646.
- Vijayachari, P, Sugunan, AP, Shriram, AN. (2008). Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J. Biosci.* 33(4): 557-569.
- Vinetz, JM, Glass, GE, Flexner, CE, Mueller, P, Kaslow, DC. (1996). Sporadic Urban Leptospirosis. *Ann Intern Med.* 125(19): 794-798.

13. Tablas

Tabla 1. Detalle de los sitios de recolección y de muestras para las provincias de Esmeraldas y Manabí.

Provincia	Localidad	Nomenclatura	Río	Fecha recolección	Observaciones
Manabí	Calderón	Cald.1A-FAST	Río Chico	14/03/2012	Acceso al río en una zona residencial, flujo medio.
	Calderón	Cald.1B-FAST	Río Chico	15/03/2012	Acceso al río a través de una finca, al lado de un cafetal.
	Santa Ana	SA.1A-FAST	Río Portoviejo	16/03/2012	Acceso al río en una zona recreacional.
	Santa Ana	SA.1B-FAST	Río Portoviejo	17/03/2012	Centro urbano de la ciudad, bajo el puente principal.
	Calderón	Cald.2A-FAST	Río Chico	23/07/2012	Acceso al río en una zona residencial, flujo medio. Nivel del río menor que en la colecta previa
	Calderón	Cald.2B-FAST	Río Chico	24/07/2012	Acceso al río en una zona residencial, flujo medio. Nivel del río menor que en la colecta previa
	Santa Ana	SA.2A-FAST	Río Portoviejo	25/07/2012	Centro urbano de la ciudad, bajo el puente principal.
	Santa Ana	SA.2B-FAST	Río Portoviejo	26/07/2012	Centro urbano de la ciudad, bajo el puente principal.
	Calceta	Calc.2A-FAST	Río Calceta	27/07/2012	Centro urbano de la ciudad, bajando hacia el río a través de escalinatas de cemento.
	Calceta	Calc.2B-FAST	Río Calceta	28/07/2012	Centro urbano de la ciudad, bajando hacia el río a través de escalinatas de cemento.
	Picoaza (Portoviejo)	Pico.2A-FAST	Río Portoviejo	29/07/2012	Zona urbana, río con flujo bajo y alta concentración de basura en

					la zona.
	Picoaza (Portoviejo)	Pico.2B-FAST	Río Portoviejo	30/07/2012	Zona urbana, río con flujo bajo y alta concentración de basura en la zona.
Esmeraldas	Maldonado	08-02B	Río Cayapas	08/02/2011	Acceso al río en zona rural, río arriba del poblado
	Maldonado	03-03B	Río Cayapas	03/03/2011	Acceso al río en zona rural, río arriba del poblado
	Maldonado	03-11B	Río Cayapas	11/03/2011	Acceso al río en zona rural, río arriba del poblado
	Rosario	R11Nov	-	12/11/2007	Riachuelo saliente del río Cayapas, alto contenido de algas y perros en la zona.
	Rosario	R12Nov	-	12/11/2007	Riachuelo principal en la entrada del poblado, zona urbana.
	San Agustín	SA15Nov	-	12/11/2007	Riachuelo principal, en zona de caseríos.
	Borbón	B1Dec	-	07/12/2007	Charco en zona urbana, presencia de algas y basura.
	Tangare	T9AB	Río Onzole	12/04/2008	Zona rural, río debajo de la zona poblada.
	Rosario	R10AB	-	13/04/2008	Riachuelo saliente del río Cayapas, río arriba de zona poblada.
	Rosario	R12AB	-	13/04/2008	Riachuelo principal en la entrada del poblado, zona urbana.
	San Agustín	SA14AB	-	14/04/2008	Riachuelo que corre paralelo a la carretera.
	San Agustín	SA15AB	-	14/04/2008	Riachuelo que corre paralelo a la carretera, cerca de un caserío.
	Tangare	T7Dec	Río Onzole	08/12/2007	Acceso río arriba de la comunidad en zona rural, sin presencia de basura o animales.
	Tangare	T8Dec	Río Onzole	08/12/2007	Acceso en la entrada principal del poblado, uso de aguas para

					lavado
Tangare	T9Dec	Río Onzole	08/12/2007		Zona rural, río debajo de la zona poblada.
Rosario	R10Dec	-	08/12/2007		Riachuelo saliente del río Cayapas, río arriba de zona poblada.
Rosario	R12Dec	-	08/12/2007		Riachuelo a la entrada del poblado, zona urbana.
San Agustín	SA13Dec	-	09/12/2007		Riachuelo que corre paralelo a la carretera.
Borbón	B1Nov	-	10/11/2007		Charco en zona urbana, presencia de algas y basura.
Borbón	B2Nov	Río Cayapas	10/11/2007		Tomado directamente del malecón (zona urbana de Borbón)
Borbón	B3Nov	-	10/11/2007		Riachuelo de flujo lento cerca de zona residencial.
Borbón	B2AB	Río Cayapas	13/04/2008		Tomado directamente del malecón (zona urbana de Borbón)
Santo Domingo	SD4AB	-	12/04/2008		Riachuelo con flujo casi nulo con casas en las cercanías, agua color verde.
Santo Domingo	SD5AB	-	12/04/2008		Riachuelo con flujo casi nulo, agua color verde y presencia de algas y animales.
Santo Domingo	SD6AB	-	12/04/2008		Riachuelo con flujo casi nulo, zona urbana
Tangare	T7AB	-	12/04/2008		Acceso río arriba de la comunidad en zona rural, sin presencia de basura o animales.

Tabla 2. Secuencias de primers utilizados en la detección de especies de *Leptospira*.

Gen	Nombre	Secuencias	Amplicón	Referencia
<i>rrs</i>	16SV3f	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'	193pb	Muyzeret <i>al</i> , 1993
	16SV3r	5'-ATTACCGCGGTGCTGG-3'		
<i>rrs</i> (16S)	A	5'-GGCGGCGCGTCTITAAACATG-3'	330pb	Mérienet <i>al</i> , 1992
	B	5'-TTCCCCCATTGAGCAAGATT-3'		
<i>rrs</i> (16S)	C	5'-CAAGTCAAGCGGAGTAGCAA-3'	289pb	Mérienet <i>al</i> , 1992
	D	5'-CTTAACCTGCTGCCTCCCGTA-3'		
<i>rrs</i> (16S)	Inter	5'-TCTTTACCTATCARATCYGTGATCCA-3'	160pb/ 143pb	No publicado (diseñados y estandarizados por Jorge Chiriboga)
<i>secY</i>	secYIVF(deg)	5'- GCGATTCAGTTTAATCCTGC-3'	202pb	Ahmed <i>et al</i> , 2009
	secYIV(deg)	5'-GAGTTAGAGCTCAAATCTA-3'		
<i>lipL32</i>	LipL32-270F	5'-CGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATT-3'	423pb	Levettet <i>al</i> , 2005
	LipL32-692R	5'-CCAACAGATGCAACGAAAGATCCTTT-3'		

Tabla 3. Resumen de experimentos para detección de especies intermedias de *Leptospira* en muestras de agua obtenidas de la provincia de Manabí.

Muestra	Resultado Inter Noviembre 2012	Resultado Inter Abril 2013		Positivo Intermedias
	CD	AB	CD	
Calc.2BFAST	Positivo intenso sp. Intermedia	Positivo sólido <i>Leptospira</i> . Positivo sp. Intermedias.	Negativo <i>Leptospira</i> .	Si
Calc.2AFAST	N/A	Negativo <i>Leptospira</i> .	Negativo <i>Leptospira</i> .	No
SA2AFAST	Positivo intenso sp. Intermedia	Positivo sólido <i>Leptospira</i> . Positivo sp. Intermedia.	Positivo <i>Leptospira</i> . Negativo sp. Intermedias.	Si
Pic.2AFAST	N/A	Positivo sólido <i>Leptospira</i> . Negativo sp. Intermedias.	Positivo <i>Leptospira</i> . Potencialmente positivo sp. Intermedias.	Si
Cald.2AFAST	Positivo intenso sp. Intermedia	Positivo sólido <i>Leptospira</i> . Potencialmente positivo sp. Intermedias.	Positivo <i>Leptospira</i> . Potencialmente positivo sp. Intermedias.	Si
Cald.1(3)	Negativo sp. intermedia	Positivo sólido <i>Leptospira</i> . Negativo sp. Intermedias.	Posiblemente negativo <i>Leptospira</i> .	No
Cald.2(3)	Positivo débil sp. Intermedia	Negativo <i>Leptospira</i> .	Potencialmente positivo <i>Leptospira</i> . Negativo sp. Intermedias.	Si
Pic.2BFAST	Positivo intenso sp. Intermedia	Positivo sólido <i>Leptospira</i> . Positivo sp. Intermedias.	Potencialmente positivo <i>Leptospira</i> . Negativo sp. Intermedias.	Si
Cald.2BFAST	N/A	Positivo sólido <i>Leptospira</i> . Negativo sp. Intermedias.	Positivo <i>Leptospira</i> . Negativo sp. Intermedias.	No
SA2BFAST	Positivo débil sp. Intermedia	Positivo sólido <i>Leptospira</i> . Negativo sp. Intermedias.	Posiblemente positivo <i>Leptospira</i> . Negativo sp. Intermedias.	Si
SA2	Positivo débil sp. Intermedia	N/A	N/A	Si
				TOTAL: 8

Tabla 4. Resultados de alineamientos con BLAST para las secuencias obtenidas de los productos de PCR del gen *lip32*.

Provincia	Fecha de recolección	Muestra	Fuente de agua	Identidad	Valor E*	Resultado	Registro con mayor similitud
Esmeraldas	12/11/2007	B1 Nov	Charco en Borbón	99%	0.00	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	EU882034.1
	10/11/2007	B3 Nov	Riachuelo en Borbón	100%	0.00	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	EU882034.1
	8/12/2007	R12 Dec	Riachuelo Rosario	100%	0.00	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	EU882034.1
	13/04/2008	B2 AB**	Río Cayapas	86%-87%	6e-31	<i>Leptospira interrogans</i>	JQ013519.1
	12/04/2008	SD6 AB**	Riachuelo zona urbana Sto. Domingo	85%	7e-62	<i>Leptospira noguchi/interrogans/kirschneri</i>	AY461920.1
	12/11/2007	R11 Nov**	Riachuelo Rosario	92%	7e-12	<i>Leptospira santarosai</i>	AY461928.1
	12/11/2007	R12 Nov**	Riachuelo Rosario	N/A	N/A	No analizable	N/A
Manabí	24/07/2012	Cald.2B-FAST	Río Chico, ciudad de Calderón	91%	2e-147	<i>Leptospira noguchi/interrogans</i>	AY461919.1
	25/07/2012	SA.2B-FAST	Río Portoviejo, ciudad de Santa Ana	91%	8e-152	<i>Leptospira noguchi</i>	AY461918.1

*Menor valor obtenido en los alineamientos con BLAST.

**Picos de secuenciamiento mezclados.

14. Figuras

Figura 1. Protocolos de recolección de muestras de agua y extracción de ADN.

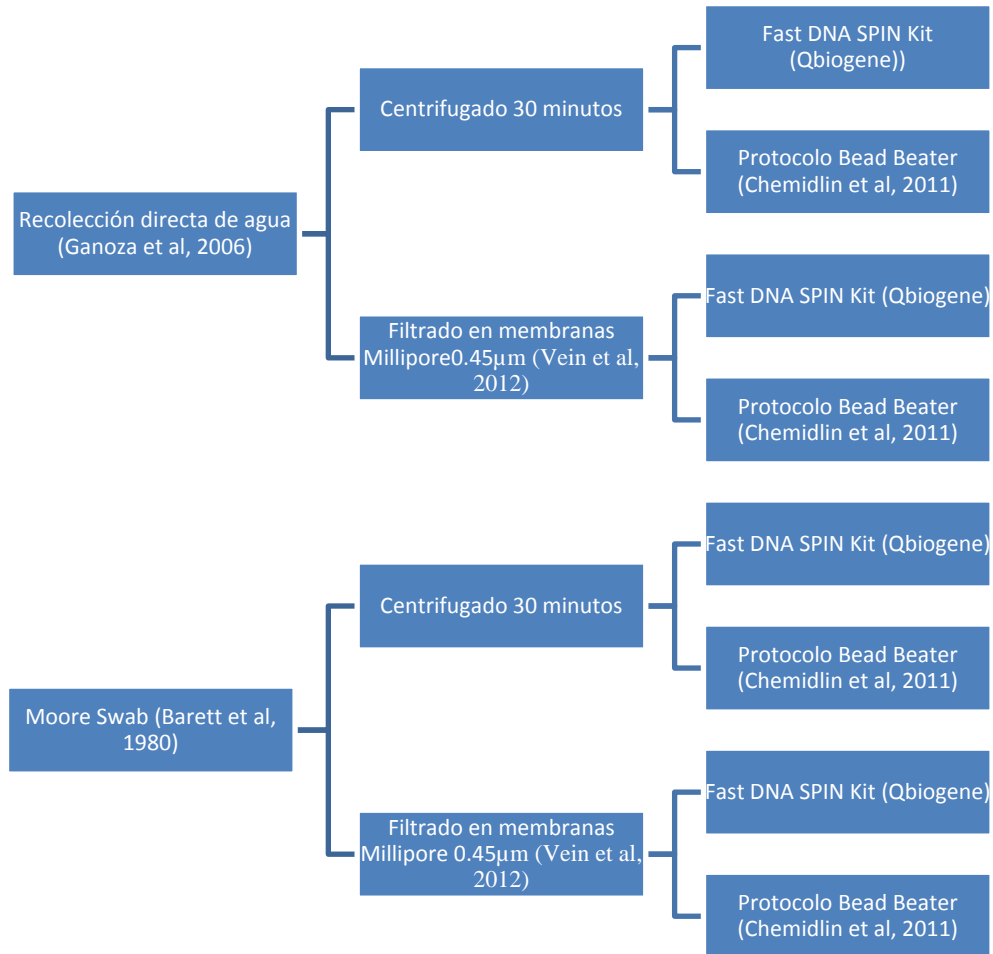


Figura 2. Amplificación por PCR convencional con primers CD de muestras de Calderón (Cald) y Santa Ana (SA), provincia de Manabí, extraídas por dos metodologías: Moore Swab (A) y centrifugación simple (B).

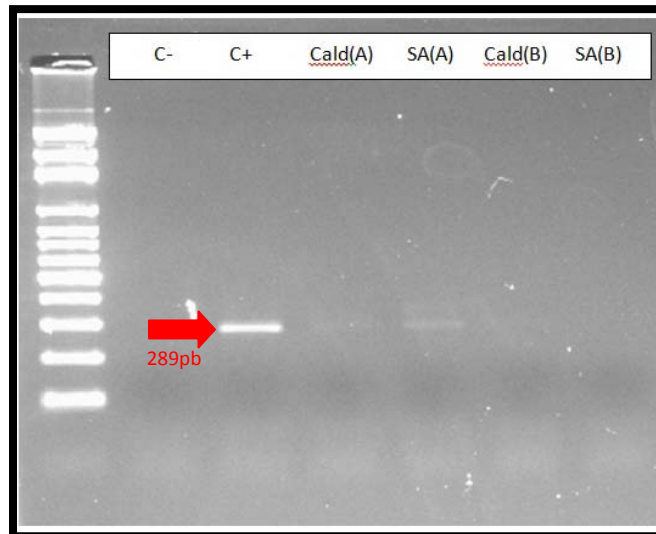


Figura 3. Límites de detección para los primers *secYIV* y *LipL32*. (a) Resultados de PCR para diluciones seriales utilizando primers para el gen *secY*. (b) Resultados de PCR para diluciones seriales utilizando primers para el gen *lipL32*. Las diluciones utilizadas para ambas reacciones son las de 1 célula/mL (S1), 10 células/mL (S10), 100 células/mL (S100) y 1000 células/mL (S1000). Todos los resultados presentes obtenidos utilizando recolección por Moore Swab (Berrett *et al*, 1980).

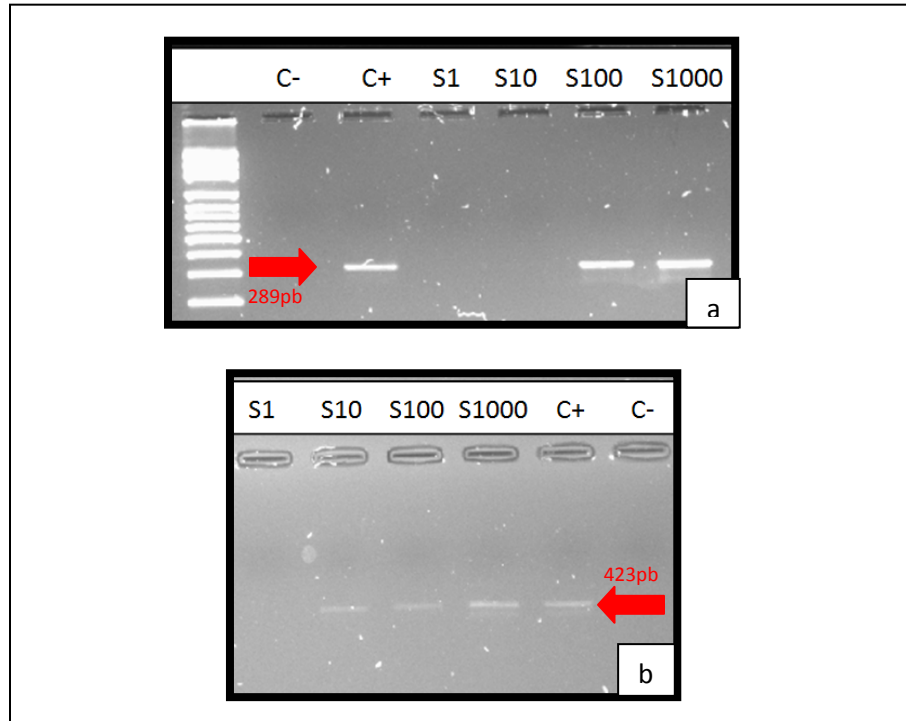


Figura 4. Resultados de prueba de límite de detección en qRT-PCR para *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo utilizando primers Lip32. (a) La curva de amplificación muestra amplificación positiva para las diluciones de 1000 células/mL y 100 células/mL, con valores de Ct de 36.44 y 41.15 respectivamente. Control positivo se muestra en rojo. (b) Los resultados de las curvas de fusión muestran valores de Tm de 85°C para las diluciones de 1000 células/mL y 100 células/mL, al igual que el control positivo (rojo). Las diluciones de 10 células/mL y 1 célula/mL no muestran amplificación, por lo que no presentan valores de Ct ni curvas de fusión en ninguno de los dos gráficos.

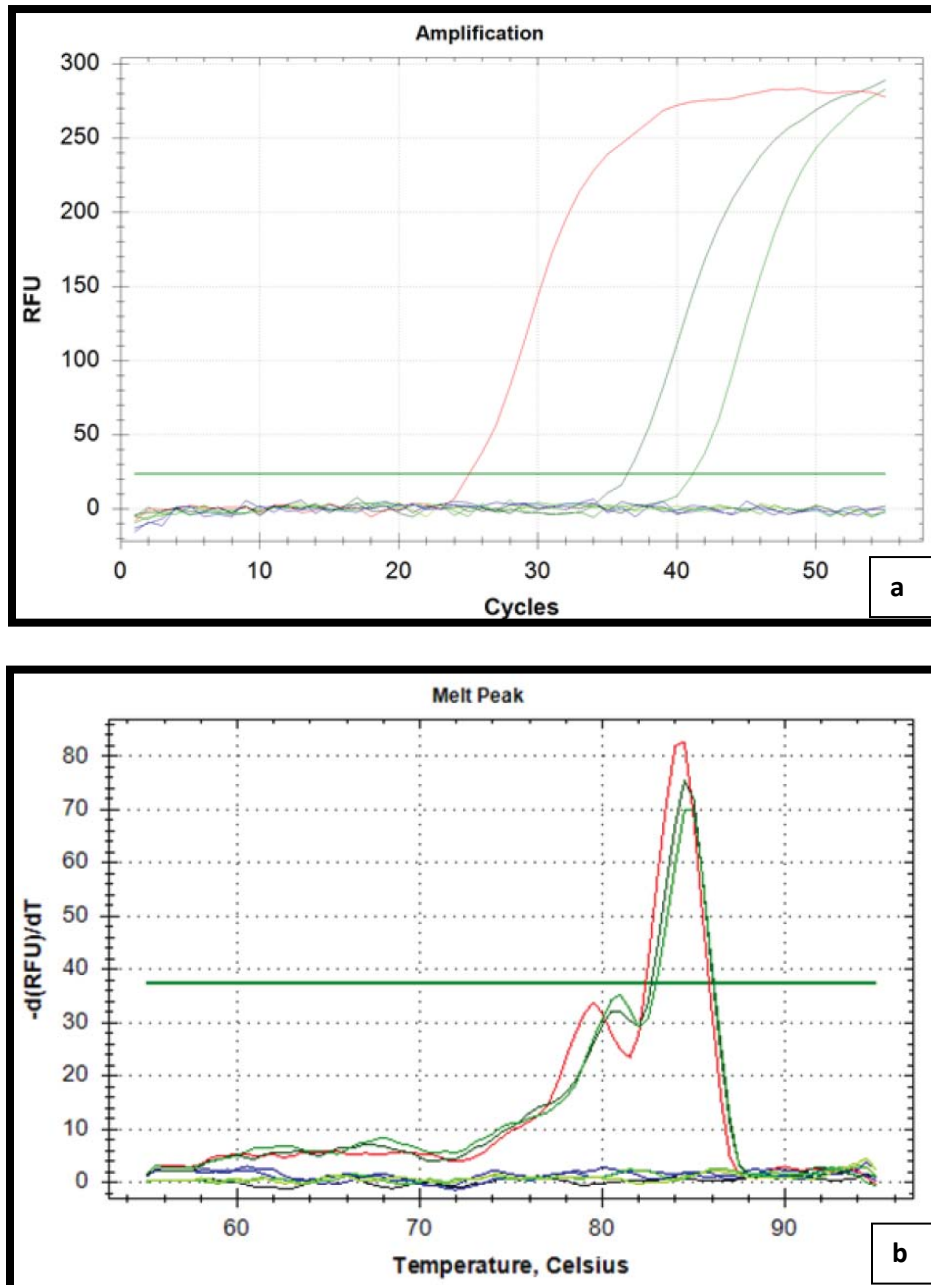


Figura 5. Confirmación de tamaño de producto de PCR para fragmento generado con primers secYIV, utilizando ADN de *Leptospira interrogans* serovar Lai. Este fragmento fue generado a partir de una reacción de qRT-PCR, posteriormente corrida en un gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR Safe (Invitrogen).

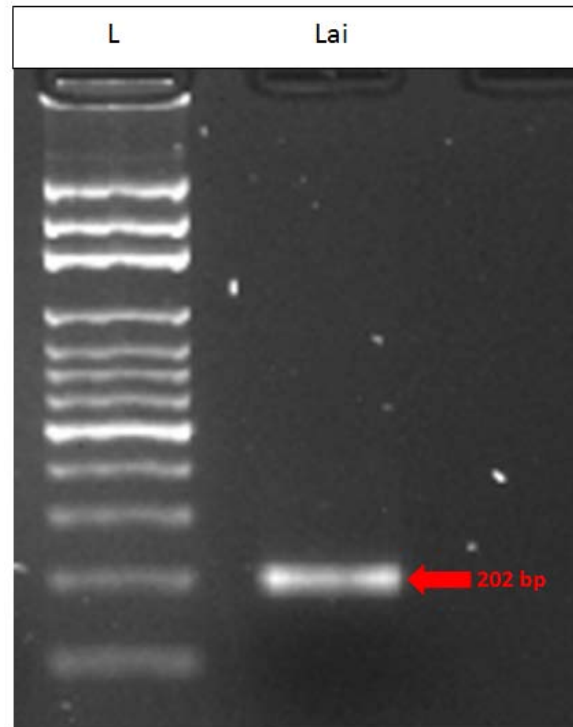


Figura 6. Resultados de amplificación por PCR convencional para detección de especies intermedias de *Leptospira* en muestras de agua de Manabí (Calderón, Santa Ana, Picoza y Calceta) y Esmeraldas (Rosario, Borbón y Santo Domingo), con primers C-Inter. (a) Muestras de la provincia de Manabí. (b) Muestras de las provincias de Manabí (izquierda) y Esmeraldas (derecha).

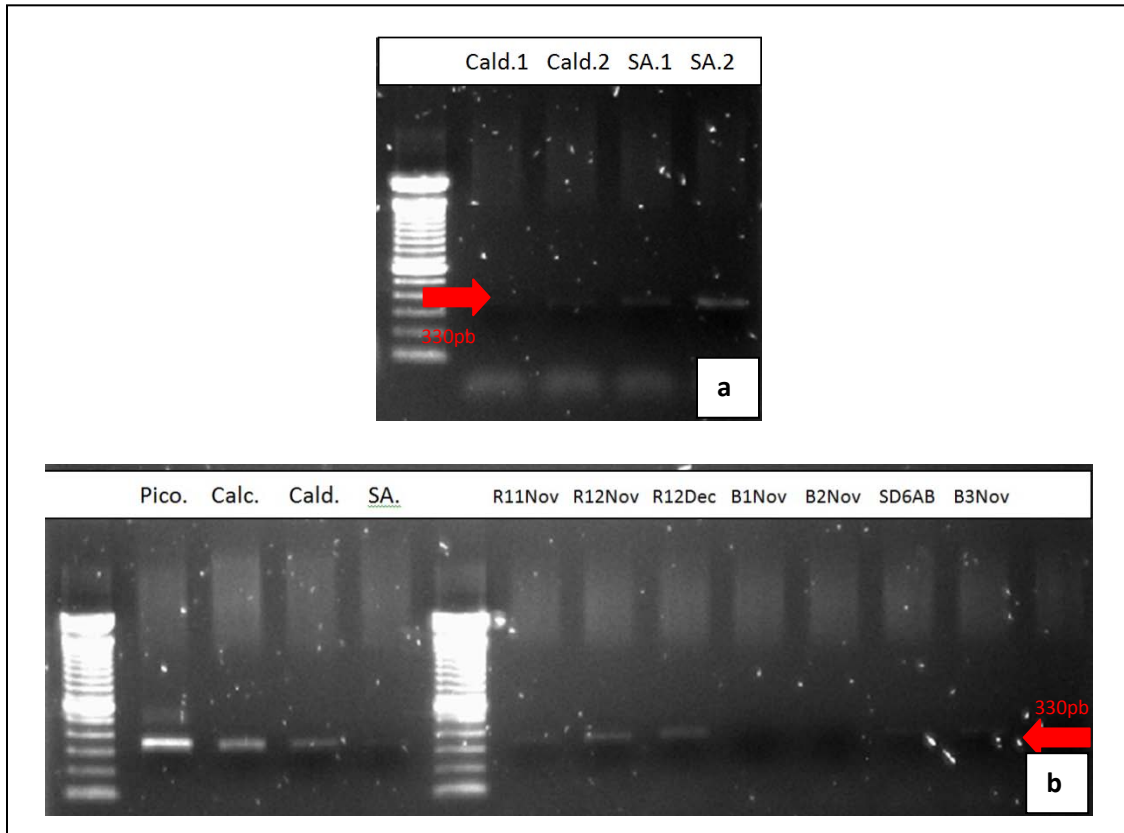


Figura 7. Espectros de secuenciación para fragmento de *lipL32* para muestras de agua. (a) SA.2B-FAST con primer LipL32F y (b) SD6AB con primer LipL32F. Se puede observar en la muestra de Esmeraldas, SD6AB, un espectro poco claro con picos dobles, que sugiere contaminación o una amplificación de especies mezcladas.

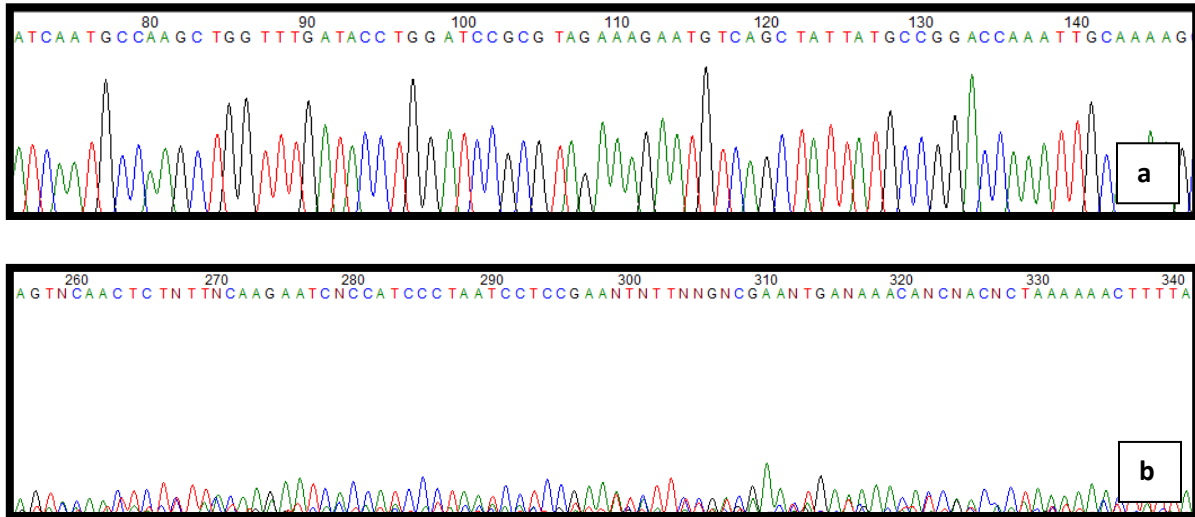
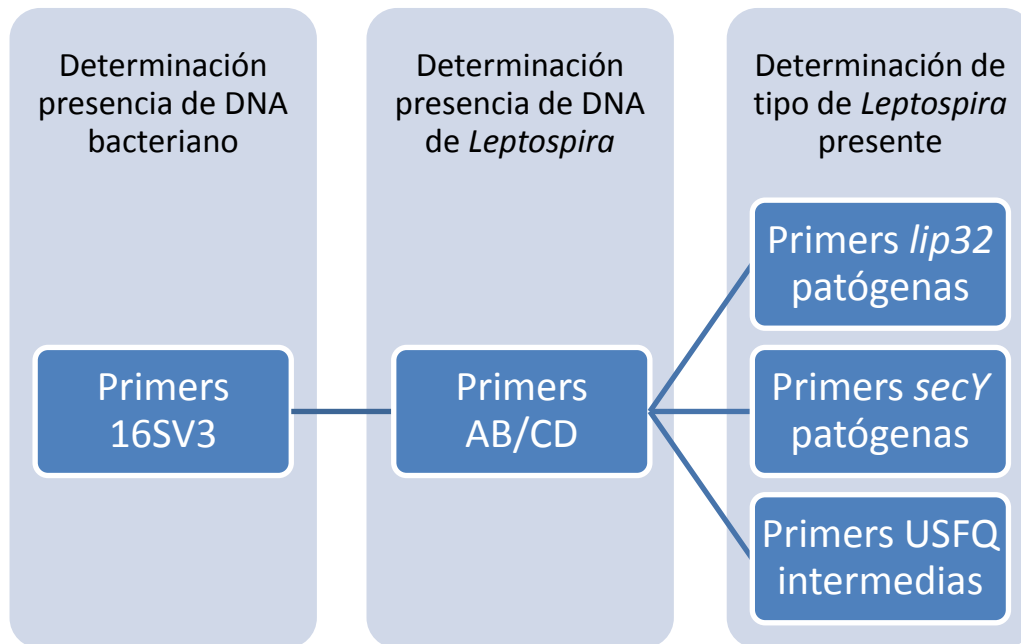


Figura 8. Algoritmo para análisis de muestras, y determinación de presencia de especies patógenas o intermedias de *Leptospira*.



15. Anexos

Anexo 1. Secuencias finales de fragmentos del gen *lipL32*, obtenidos de 8 muestras positivas de muestras de agua de río de Esmeraldas y Manabí (incluyendo un sub-fragmento de la secuencia para SD6AB).

>B1Nov

CCCAACAGGCGAAATCGGGGAACCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGATGCTTTCAAAGCGGCAACC
 CCGGAAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTTGATACCTGGATCCGTGTAGAAAGAATGTCGGCGATTAT
 GCCTGACCAAATCGCCAAAGCTGCGAAAGCAAAACCCGTTCAAAAATTGGACGATGATGATGATGGTG
 ATGATACTTATAAAGAAGAGAGACACAATAAATACAACTCTTTACTAGAATCAAGATCCCAAATCCTC
 CAAAATCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGATACTAAAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAATTTT
 TTTCACTACCTACAAACCAGGTGAAGTGAAGGATCTTTCGTTGCATTCTGTTGGAG

>B3Nov

GAGTTCGTATGATTTCCCAACAGGCGAAATCGGGGAACCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGATGC
 TTTCAAAGCGGCAACCCCGGAAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTTGATACCTGGATCCGTGTAGAAA
 GAATGTCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGCCAAAGCTGCGAAAGCAAAACCCGTTCAAAAATTGGAC
 GATGATGATGATGGTGATGATACTTATAAAGAAGAGAGACACAATAAATACAACTCTTTACTAGAAT
 CAAGATCCCAAATCCTCCAAAATCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGATACTAAAAACTTTTAGTAAG
 AGGTCTTTACAGAATTTCTTTCACTACCTACAAACCAGGTGAAGTGAAGGATCTTTCGTT

>R12Dec

GAGTTCGTATGATTTCCCAACAGGCGAAATCGGGGAACCAGGCGACGGAGACTTAGTAAGCGATGC
 TTTCAAAGCGGCAACCCCGGAAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTTGATACCTGGATCCGTGTAGAAA
 GAATGTCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGCCAAAGCTGCGAAAGCAAAACCCGTTCAAAAATTGGAC
 GATGATGATGATGGTGATGATACTTATAAAGAAGAGAGACACAATAAATACAACTCTTTACTAGAAT
 CAAGATCCCAAATCCTCCAAAATCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGATACTAAAAACTTTTAGTAAG
 AGGTCTTTACAGAATTTCTTTCACTACCTACAAACCAGGTGAAGTGAAGGATCTTTCGTT

>Cald.2B-FAST

GAGTTCGTATGATTTCCCAACAGGCGAAATCGGTGAACCAGGCGATGACGATTTAGTAAGTGACGCT
 TTCAAAGCTGCGACTCCAGAAGAAAAATCAATGCCAAGCTGGTTTGATACCTGGATCCGCGTAGAAAG
 AATGTCAGCTATTATGCCGGACCAAATTGCAAAAGCTGCGAAAGGAAAAGCGGTTCAAAAATTGGACG
 ACGACGATGACGGGGACGATACTTACAAAGAAGAGAGACACGCAAAGTACAACCTCTTTACAAGAATC
 ACCATCCCTAATCCTCCGAAATCTTTGACGAACTGAAAAACATCGACACTAAAAAAGCTTTTAGTGAGA
 GGTCTTTACAGAATCTCTTTACCACCTACAAACCAGGTGAAGTGAAAGGATCTTTTCGTT

>SA2.B-FAST

GGGAGTTCGTATGATTTCCCAACAGGCGAAATCGGTGAACCAGGCGATGACGATTTAGTAAGTGACG
 CTTTCAAAGCTGCGACTCCAGAAGAAAAATCAATGCCAAGCTGGTTTGATACCTGGATCCGCGTAGAA
 AGAATGTCAGCTATTATGCCGGACCAAATTGCAAAAGCTGCGAAAGGAAAAGCGGTTCAAAAATTGG
 ACGACGACGATGACGGGGACGATACTTACAAAGAAGAGAGACACGCAAAGTACAACCTCTTTACAAG
 AATCACCATCCCTAATCCTCCGAAATCTTTGACGAACTGAAAAACATCGACACTAAAAAAGCTTTTAGTG
 AGAGGTCTTTACAGAATCTCTTTACCACCTACAAACCAGGTGAAGTGAAAGGATCTTTTCGTTGATTCT
 GTT

>B2AB (167 nucleótidos recuperados)

TTCCAACAAAGAAGGGAGACAGCCACAGTGCAACTCTCTTACAAGAATCACCATCCCTAATCCTCCGAA
 ATCTTTACGAACTGGAAAACATCGACACTAAAAAAGCTTTAGTGAGAGGCTTTACGAATCTCTTTACC
 CCTACAAACCAAGTGAAGGAAAGGATCT

>R11Nov (153 nucleótidos recuperados)

AGGACCTCCACGAACAGCTTCTTTAGCTATCAGATGCTTGTTTCAGCATCGCAGTCATCCGATCTTTGG
 AGGATTTGGGATCTTGATCCCCAGTAAGAGAGTTGTATTTGTTGTGTCCCTCTCCGTGATAAGTCATCA
 TCACACAGCATGA

>SD6AB (313 nucleótidos recuperados)

CCAGGCGATGCCGCCTTATTTAGCGACGCTTCAAAGCTGCGACTCCCGAAGAAAAATCAATGCCAAG
CTGGTTTGATACCTGGATCCGCGTAGAAAGAATGTCAGCTATTATGCCGGACCAAATTGCCAAAGCTGC
GAAAGGAAAAGCGGTTCAAAATTGGACGGCGACGATGACGGGGACGATACTTACAAAGAAGGAGGA
CACGCATAAGTATCATCTTTCTTACATAGAATCACCATCCCTAATCCTCCGAAATCTTTCGACGAATCTG
AAAAATCATCAGTCATCTAAAAAACGTCTAGTGATGAGGT

>SD6AB_3' (75 nucleótidos recuperados)

TAAGTATCATCTTTCTTACATAGAATCACCATCCCTAATCCTCCGAAATCTTTCGACGAATCTGAAAAATC
ATCA