

1. Enfermedades transmisibles -- Animales -- Ecuador.
2. Leptospirosis -- Manabí (Ecuador: Provincia) -- Tesis y disertaciones académicas
3. Enfermedad de Weil.

Tesis
SF
809
.L4
A7
2011

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**Investigación de *Leptospira* en animales portadores en la
parroquia Calderón- Manabí.**

María Gabriela Arroyo Guarderas

101055

USFQ-BIBLIOTECA

Tesis de grado presentada como requisito para la
Obtención del título de MEDICO VETERINARIO

Quito, Julio de 2011

9

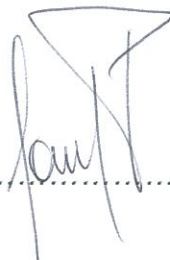
**Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Medicina Veterinaria**

HOJA DE APROBACION DE TESIS

**INVESTIGACION DE *LEPTOSPIRA* EN ANIMALES PORTADORES EN LA
PARROQUIA CALDERON- MANABI**

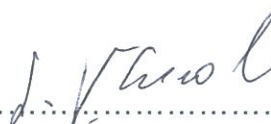
María Gabriela Arroyo

Gabriel Trueba
Director de la Maestría en Microbiología
Director de la Tesis



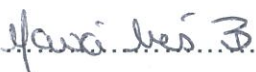
.....

Luis Vasco
Miembro del Comité de Tesis



.....

María Inés Baquero
Miembro del Comité de Tesis



.....

Nombre, título académico
Decano del Colegio de Medicina Veterinaria



.....

Quito, Julio de 2011

©Derechos de Autor

Maria Gabriela Arroyo Guarderas

2011

Dedicatoria

Esta tesis dedico a Jorge Tamariz quien supo apoyarme a lo largo de la carrera motivándome a hacer mis sueños realidad.

Agradecimiento

Este trabajo de investigación fue posible gracias a la colaboración y apoyo incondicional de personas muy valiosas como son: los Verónica Barragán y María Inés Baquero.

También quiero agradecer a MVZ Luis Donoso quien estuvo guiándome en el proceso de este proyecto.

Otras personas importantes que colaboraron en este estudio son María Eugenia Mejía, Nadia López y Juan Carlos Escobar.

A mi familia por la paciencia y la motivación que me dieron a lo largo de la carrera y de la presente investigación.

Finalmente a MZV José Rubén Castro por ser una guía en mi carrera y en mi vida.

A todos ustedes muchas gracias por su apoyo.

Resumen

Lepto La leptospirosis es una enfermedad emergente en varios países en vías de desarrollo e industrializados, con una prevalencia global anual que alcanza los 500,000 casos severos en humanos (Eshghi A, et al., 2009; Vinetz, 2001). Se tomaron muestras de orina y riñón de bovinos, caninos, porcinos y ratas en la parroquia de Calderón, Provincia de Manabí. Estas muestras fueron analizadas por PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa) y se encontró un setenta y dos por ciento de positividad. El análisis de las secuencias de amplicones sugirió que *L. inadai* es una especie de *Leptospira* dominante en esta zona. El significado de estos resultados es aun incierto para la salud pública.

Tabla de Contenido

Abstract

Leptospirosis is an emergent disease in several developing and industrialized countries, with a worldwide incidence that reaches 500,000 severe human cases annually (Eshghi A, et al., 2009; Vinetz, 2001). Urine and kidney samples from cattle, pigs, dogs and rats were collected in Calderon, Manabí. Seventy two percent of samples were positive for leptospirosis by PCR (Polimerase Chain reaction). Sequence analysis was performed with the amplicons, suggesting that *Leptospira inadai* is a dominant circulating specie in the area. It is still unclear the significance of these findings for public health.

Epidemiología

Patogénesis

Signos

Diagnóstico

Materiales

Métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Referencias

Agradecimientos

Discusión

Conclusiones

Referencias

Tabla de Contenido:

Introducción	1
Revisión Literatura	4
<i>Leptospira</i> y leptospirosis	4
Clasificación	5
Etiología	6
Epidemiología	6
Patogénesis	7
Signos clínicos y Tratamiento	8
Diagnostico	10
Materiales y Métodos	13
Localidad de toma de muestras	13
Extracción de ADN	14
Amplificación de ADN de <i>Leptospira</i> en orina utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	15
Secuenciación	16
Resultados	16
Discusión	19
Conclusiones	20
Recomendaciones	21
Material de Referencia	
Bibliografía	23
Anexos	28

Lista de figuras y gráficos

Tabla 1: Resultados de PCR por comunidad y por especie animal

Tabla 2: Positividad de acuerdo a la especie animal

Anexo 1: Micrografía por barrido de electrones

de *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae

Anexo 2: Epidemiología de la Leptospirosis

Anexo 3: Extracción ADN

Anexo 4: Amplificación de ADN de *Leptospiras* patógenas

Anexo 5: Secuencias limpias de *Leptospira*

Anexo 6: Alineación de las secuencias

1. Introducción:

La leptospirosis es una zoonosis causada por la *Leptospira*, una espiroqueta de la familia *Leptospiraceae* del orden Spirochaetales (Cerqueira et al, 2009). Morfológicamente, la *Leptospira* es delgada de forma helicoidal con los extremos en forma de gancho. Son microorganismos demasiado delgados para poder ser observados en un microscopio común, es por esto que se recurre a la utilización del microscopio de campo oscuro (World Health Organization, 2003) (Anexo 1).

Actualmente, la leptospirosis es considerada como una enfermedad reemergente que afecta a humanos y animales en países en vías de desarrollo e industrializados especialmente en zonas tropicales (Bharti et al, 2003; Narita et al, 2001; Agudelo-Flórez, 2008; Koizumi et al, 2009). Se encuentra dispersa a nivel mundial excepto en la Antártica. La mayoría de mamíferos son susceptibles a al menos una especie de *Leptospira* y muchos de ellos pueden ser portadores de ésta ayudando a su transmisión y prevalencia (Adler, de la Peña Moctezuma, 2009).

En Europa la seroprevalencia humana es del 8% en poblaciones asintomáticas no expuestas y 18% en aquellas expuestas. En otros continentes como en el Asia, la prevalencia es mayor al 35% (Gelosa, Perone, 1989; Van et al, 1998). Finalmente, en América, en áreas urbanas marginales y rurales la prevalencia se encuentra entre 17 y 25% (Pereira, Andrade, 1990)

El mayor número de casos en humanos se encuentran en lugares donde la higiene no es la adecuada (carencia de alcantarillas y presencia de ratas) y de alta humedad ya que la bacteria es capaz de sobrevivir hasta meses en fuentes

acuosas si las condiciones son ideales (World Health Organization, 2003; Roca, 2006). Es considerada como una enfermedad ocupacional debido a que afecta a la gente que se encuentra en contacto con animales, como es el caso de veterinarios, ganaderos y aquellos que manipulan basura y desechos (De Vasconsuelos *et al.*, 1993; Eshghi *et al.*, 2009; Narita *et al.*, 2001).

1.1 Epidemiología de la enfermedad en animales

de sin La incidencia de leptospirosis es estacional. Estudios demuestran que los casos incrementan en períodos en los que hay un incremento en la humedad y lluvias (Boqvist *et al.*, 2005; Alonso-Andicoberry *et al.*, 2001)

adecu La transmisión de la enfermedad puede ser directa entre hospederos o indirecta a través del ambiente (masas de agua dulce). Existen varias vías de entrada del agente, contacto directo a través de las mucosas o abrasiones en la piel con fluidos corporales de animales infectados, ingestión de agua e incluso por aerosoles de orina o agua contaminada (Koizumi *et al.*, 2009) (Anexo 2). El agente puede ingresar al organismo a través de la piel si el individuo permanece un periodo de tiempo considerable en el agua que contiene este agente. Los animales infectados liberan grandes cantidades de *Leptospira* en la orina, adicionalmente esta bacteria se la encuentra en fetos de animales abortados o mortinatos, descargas vaginales e incluso en los órganos reproductivos femeninos y masculinos (Center for Food Security and Public Health, 2005). La transmisión humano- humano no es común, sin embargo han sido descritos casos por transmisión sexual y lactancia (Center for Food Security and Public Health, 2005). Comúnmente, los humanos se contaminan por medio de la orina de roedores quienes son el reservorio más importante del agente y, debido a su

diagnos

densa población, son unos de los mayores transmisores del microorganismo (Roca, 2006). Finalmente, en Manabí, en el año 2007 se

La leptospirosis es una patología de alta importancia en la población humana y animal, se estima que la incidencia en humanos a nivel mundial alcanza los 500,000 casos severos por año, siendo este dato subestimado por la deficiencia en los métodos de diagnóstico, su diversidad serológica y la variación de síntomas que se presentan (Bharti et al, 2003; Eshghi et al, 2009).

Debido a la gran diversidad de especies de *Leptospira* que existen en el mundo, inicialmente se pensaba que cuando las condiciones ambientales eran adecuadas todos los animales podrían contribuir a la infección humana, es decir varias especies de *Leptospiras* podrían infectar a una comunidad. Sin embargo, datos recientes parecen indicar que ciertas especies de *Leptospira* puede invadir el ambiente e infectar a animales y humanos, de tal manera que en ciertas localidades múltiples especies animales incluyendo humanos están infectados con la misma cepa de *Leptospira* (Thaipadungpanit et al., 2007; Nalam et al., 2010).

En los barrios suburbanos de ciudades costeras de Ecuador y otros países en vías de desarrollo la leptospirosis humana ocurre frecuentemente durante los periodos de lluvia (Dirección Provincial de la Salud de Manabí, 2008). A partir del fenómeno del Niño en 1998, el Ministerio de Salud y las autoridades sanitarias de la provincia de Manabí han mejorando su capacidad de diagnóstico de esta enfermedad. En 1998 en la zona urbana de Portoviejo, 157 casos fueron diagnosticados, entre ellos 7 defunciones (Moreno, 2008). En el año 2007 se presentaron 137 casos en humanos en este cantón y, en el 2008, se diagnosticaron 259 casos de los cuales el 41.7% formaba parte de varias

localidades de la parroquia de Calderón (Dirección Provincial de la Salud de Manabí, 2008). Finalmente, en Manabí, en el año 2009, se diagnosticaron 336 casos, de estos, 256 fueron en Portoviejo de los cuales el 47.6% se encontraban en Calderón. En épocas de lluvia (Enero- Abril) los casos semanales tienden a incrementarse (Moreno, 2008), demostrando que las lluvias y las inundaciones juegan un papel importante en la circulación del agente (Dirección Provincial de la Salud de Manabí, 2008).

Debido a la incidencia de esta zoonosis en el Ecuador, es necesario conocer las especies de *Leptospira* que están causando dichos brotes, los animales que están actuando como reservorios de la enfermedad, el papel que juega el agua como vehículo de infección, etc. El objetivo del estudio fue el de establecer la presencia de *Leptospira* en la orina de mamíferos domésticos y ratas, y la posterior determinación genética de la especie de *Leptospira* presente en localidades de la parroquia Calderón, provincia de Manabí.

2. Revisión de la literatura

2.1 *Leptospira* y leptospirosis

La leptospirosis en humanos fue descrita treinta años antes de la descripción del agente causal descubierto en 1914 en Japón por Inada e Ido aislada de mineros que presentaban ictericia. Se la nombró Espiroqueta icterohemorragia y mostraba características similares a una encontrada en los Estados Unidos por Wolbach y Binger en la misma época a diferencia de que esta última era saprofítica y se la llamó Espiroqueta biflexa. En el año 1917 se observó que el agente encontrado en Japón era distinto morfológicamente al resto de espiroquetas, cambiando su nombre a *Leptospira* y se estableció que la rata

jugaba un papel importante en la transmisión del agente al humano (Morey *et al.*, 2006). La *Leptospira* se encuentra dentro de la familia

El primer caso de leptospirosis en animales fue evidenciado en 1898 en Alemania al presentarse una epidemia en perros y no se supo sino 28 años después, cuando el agente fue descubierto por Adolf Weil en Heidelberg. Tres años después de este hallazgo, mediante la inyección del microorganismo en cachorros se encontró que era el agente causal del síndrome icterohemorrágico. Al mismo tiempo se constató que el microorganismo que afectaba a humanos y animales era morfológicamente muy similar. Durante la primera mitad del siglo XX, se estableció que *leptospiras* morfológica y serológicamente iguales podían afectar a humanos y animales siendo importante a nivel de medicina humana y veterinaria (Beran *et al.*, 1994).

complica el

2.2 Clasificación

2.3 A la *Leptospira* se le ha clasificado varias veces en la historia y por distintos métodos. Hasta 1989 se la clasificó por serología y estaba dividida en dos especies, las saprofitas (*L. biflexa*) y las patogénicas (*L. interrogans*) subdivididas en serovares (Xue *et al.*, 2009). Aunque taxonómicamente esta clasificación no tiene importancia, esta es de gran aporte en el campo de diagnóstico y epidemiológico (Virginie *et al.*, 2002).

alguno Actualmente se clasifica a la *Leptospira* en base a la secuenciación del ADN y, dentro de cada especie se encuentran varios serovares. Se han determinado al menos 13 especies de *Leptospira* divididas en 3 clases, patogénicas, intermedias y no patogénicas (Matthias *et al.*, 2008; Levett, 2001).

2.2 Etiología

La *Leptospira* se encuentra dentro de la familia *Leptospiraceae*, son bacterias motiles delgadas con uno o ambos extremos en forma de gancho. Su tamaño puede variar entre 6-20 μm por 0.1 μm de ancho. Son aerobias obligatorias capaces de sobrevivir en aguas estancadas, ríos, suelo húmedo y lodo a temperaturas entre 28 y 30 °C (Smith, Turner, 1961; Quinn *et al.*, 2002).

En la membrana externa el agente tiene lipopolisacaridos que tienen una composición similar a la de una bacteria gram- negativa pero de menor actividad endotóxica. Esta no tiene la capacidad de tinción utilizando métodos convencionales y solo se la puede observar utilizando microscopia de campo oscuro (Quinn *et al.*, 2002). Morfológicamente todas las especies son iguales es por esto que la diferenciación entre patogénicas, intermedias y saprofiticas complica el diagnostico (Ellis *et al.*, 1983).

2.3 Epidemiología

A los animales, incluyendo al ser humano se los puede dividir en hospederos primarios y secundarios. Un hospedero primario es aquel en el que la enfermedad es endémica y normalmente no presentan signos clínicos. El hospedero secundario es aquel que al ser infectado presenta signos leves o graves de la enfermedad. Una especie animal puede ser hospedero primario de algunos serovares y secundario de otros (Levett, 2001) dependiendo de la zona geográfica, como es el caso de la mangosta pequeña de la India que mantiene el serovar Serjoe e Icterohaemorrhagiae en Hawaii y, los serovares Icterohaemorrhagiae y Djatzi en Puerto Rico (Bharti *et al.*, 2003).

En el humano, la prevalencia de los distintos serovares depende de los diferentes hospedadores, del ambiente, de las diferentes prácticas de agricultura y ganaderas y de factores culturales (Kaushik *et al.*, 1999). En el mundo hay variaciones en los hospederos primarios y los serovares que presentan, y, para entender la epidemiología de cierto brote es necesario conocer el serovar circulante en dicha zona (Levett, 2001).

El agente se localizan en los túbulos renales y son excretados durante días, meses o inclusive años por la orina (Levett, 2001). Un individuo infectado sea animal o humano puede permanecer asintomático excretando al agente a través de la orina durante toda su vida (Bharti *et al.*, 2003).

Existe también una alta tasa de contagio en personas que hacen deportes acuáticos como es la natación, la pesca, el rafting entre otros (Narita *et al.*, 2001). Aquí, los brotes se dan en épocas de competencia y cálidas en las cuales la gente tiene más contacto con el agua y las condiciones para la sobrevivencia del agente son óptimas (Levett, 2001; Bharti *et al.*, 2003).

Debido a los grandes brotes en Nicaragua, Brasil, India, Asia, EE.UU y, a partir del fenómeno del Niño, la leptospirosis ha sido considerada como una enfermedad infecciosa emergente llamando la atención nuevamente debido al aumento de casos por las inundaciones causadas (Levett, 2001).

2.4 Patogénesis

Las *Leptospiras* invaden el tejido del hospedero y se esparcen en el organismo vía sanguínea. Diez días después del contacto y entrada del agente existe la presencia de anticuerpos aunque ya no de la bacteria en la circulación.

Estas pueden evadir el sistema inmune permaneciendo en los túbulos renales y, en menor proporción, en el útero, ojos y meninges (Quinn *et al.*, 2002).

Uno de los mecanismos para establecer infección de la bacteria es el alterar la expresión del proteoma dependiendo de las condiciones ambientales como es la disponibilidad de hierro y presencia de factores del hospedero. Para poder detectar estas condiciones, el agente cuenta con proteínas de membrana externa las cuales activan señales para la vía de transducción, la alteración del proteoma y la inducción de condiciones que favorecen la sobrevivencia de la *Leptospira*. Asimismo, estas proteínas de membrana externa son las que pueden causar la destrucción del agente si este es detectado por el sistema inmune del hospedero (Braun y Braun, 2002).

Existen estudios que muestran que la *Leptospira* tiene quimiotaxis por la hemoglobina siendo este uno de los factores del inicio de la infección al igual que la capacidad de evadir la fagocitosis induciendo la apoptosis de los macrófagos (Yuri *et al.*, 1993)

2.5 Signos clínicos y tratamiento

Existe un amplio espectro en relación a los síntomas en humanos que muestra la enfermedad, estos pueden ir desde asintomáticos hasta la presentación del clásico síndrome de Weil el cual presenta anemia hemolítica, ictericia, hemoglobinuria y hemorragias en su forma más severa (Kaushik *et al.*, 1999; Quinn *et al.*, 2002). A la leptospirosis se la puede dividir en dos fases, una aguda que puede durar hasta una semana con síntomas inespecíficos y una fase inmune la cual puede durar hasta 30 días en la cual hay circulación de anticuerpos y la excreción y diseminación de la bacteria a través de la orina

presentando signos clínicos leves (World Health Organization, 2003; Levett, 2001).

Existe una gran variedad de signos clínicos que pueden o no estar presentes. Puede darse la leptospirosis icterica como anictérica que es lo más común pero de menor severidad. Se ha reportado que se puede producir la muerte de los pacientes si se llega a presentar el síndrome hemorrágico pulmonar. La forma icterica es la más severa y en la que se encuentran afectados varios órganos (hígado, riñón, sistema nervioso central) aunque se ha demostrado que la función renal se mantiene a pesar de la ictericia (World Health Organization, 2003).

2.8.1 En animales la presentación de síntomas varía dependiendo del serovar y si el hospedero es primario o secundario. Si el animal es el hospedero primario hay una respuesta serológica baja y los signos clínicos son leves pudiendo o no presentarse daño renal crónico (Bolin, 1996). En hospedadores secundarios la severidad de síntomas es mayor dependiendo de la susceptibilidad del animal. Se presenta fiebre, inapetencia, vomito, dolor abdominal, diarrea, poliuria, polidipsia, mialgia, ictericia, hematuria e infertilidad (Rentko *et al.*, 1992). En bovinos se presentan abortos, mortinatos, baja producción, agalactia y mastitis en los cuatro cuartos (Fearnley *et al.*, 2007). En cerdos causa aborto y mortinatos. En caninos puede haber fallas reproductivas así como también daño renal y hepático; aquellos animales que sobreviven la fase aguda pueden desarrollar síndrome urémico agudo y la muerte (Quinn, *et al.*, 2002).

2.8.2 La sintomatología de la infección puede variar de sub clínica a crónica dependiendo de la especie animal y el serovar infectante. En ciertos animales la bacteria coloniza los túbulos renales sin presentar síntomas, convirtiéndose en

transmisores de la enfermedad mediante leptospiuria (Acha y Zyfres, 1986; Koizumi et al, 2009).

La tetraciclina y cefalosporina, así como otros β lactámicos son efectivos en estados agudos de la enfermedad aunque su diagnóstico en esta etapa sea difícil (Eshghi *et al.*, 2009). En animales, los antibióticos más utilizados son penicilina, ampicilina, dihidroestreptomicina, estreptomicina y fluoroquinolonas. Se debe emplear distintos tratamientos de soporte dependiendo de los signos clínicos presentes. La eficacia de este dependerá del serovar infectante (World Health Organization, 2003).

2.6 Diagnóstico

Los métodos convencionales de diagnóstico de leptospirosis son el cultivo y serología. Comúnmente se emplea la prueba de Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) y la aglutinación microscópica (MAT) las cuales no diferencian entre una infección natural y vacunación (Baquero *et al.*, 2010). Otros métodos de diagnóstico son las pruebas moleculares como la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la observación de la misma a través de microscopía de campo oscuro (Mérien *et al.*, 2005) a partir de muestras de sangre, orina o tejidos aunque es una prueba no es específica (Agudelo-Flórez *et al.*, 2008). El aislamiento del agente es complicado debido a su costo elevado y al grado de dificultad que este presenta (Baquero *et al.*, 2010)

2.6.1 Identificación de *Leptospira* mediante la utilización de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa):

El uso de secuencias del gen del ARN ribosómico (rRNA) 16S contiene la huella digital de secuencia especie específica muy útil para la identificación de una bacteria, permitiendo que se pueda secuenciar un set de oligonucleótidos dentro de la estructura primaria de la *Leptospira* (Acha y Zyfres, 1986; Gravekamp et al, 1993; Beran et al, 1994; Morey et al., 2006). Esta región se mantiene funcionalmente constante, y se distribuye mundialmente correspondiendo solo a *Leptospiras* (Fearnley et al., 2007).

Reacción: La técnica se basa en la amplificación del ADN que se lleva a cabo en 30 ciclos. Al amplificar ADN, es necesario tener iniciadores, cebadores o primers. Estos deben ser capaces de unirse mediante complementariedad de bases a la cadena molde, es por esto que hay primers forward y reverse. La cadena de ADN se separa, aquí es cuando el uno de los primers se une, para poder seguir sintetizando el resto de la cadena, obteniendo una “nueva cadena molde”. Con esta cadena molde, actúa el otro primer, para obtener otra cadena de ADN y así continúa el proceso de amplificación (Mérien et al., 1992).

Cada ciclo está formado por:

Denaturación: el ADN molde se abre en 2 hebras permitiendo el anclaje de los primers a una temperatura de 94°C por 3 minutos. Solo el primer ciclo de la denaturación se da en 3 minutos, los próximos 29 se dan en 1 minuto.

Alineamiento: unión de los primers a la región de la cadena molde donde encuentran sus bases complementarias. Se da a 63°C por 1.5 minutos.

Elongación: proceso en el cual actúa la polimerasa añadiendo los nucleótidos complementarios a la cadena molde. Se da a 72°C por 2 minutos (Mérien et al., 1992). (Sambrook, MacCallum, 2001).

Dependiendo de la fase de infección se seleccionan las muestras a ser analizadas. Se puede obtener sangre o líquido cefalorraquídeo cuando la infección se encuentra en la fase aguda, la cual dura alrededor de 10 días. Posterior a los mismos, la *Leptospira* se mantiene en los túbulos renales, pudiendo permanecer en esta ubicación por meses, motivo por el cual, se utilizan muestras de orina para identificar el antígeno mediante PCR (Mérien *et al.*, 1992; Levett, 2001)

Reactivos:

- El agua debe ser libre de nucleasas, y el volumen de ésta depende del volumen final que se requiera.
- El cloruro de magnesio ($MgCl_2$) es necesario ya que todas las ADN polimerasas termostables necesitan de cationes divalentes libres. Éste actúa como cofactor de la Taq Polimerasa.
- El Buffer brinda los elementos necesarios para que se dé la reacción y mantiene el pH entre 8.3 a 8.8.
- Los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) son una mezcla de los 4 nucleótidos sintéticos necesarios para que la polimerasa los use como sustrato y se pueda realizar la amplificación.
- Los primers son secuencias cortas de ADN que se utilizan para iniciar la síntesis de éste. Son oligonucleotidos complementarios a la zona flanqueante de la región que se quiere amplificar, actúan como cebadores para la síntesis de ADN la cual esta catalizada por la Taq polimerasa, los primers actúan como marcadores del sitio de inicio de la enzima (Sambrook, MacCallum, 2001).

- La Taq polimerasa: es una Polimerasa resistente a altas temperaturas. Aislada de la bacteria termo resistente, *Thermus aquaticus*. Ésta es una enzima capaz de incorporar nucleótidos libres en el extremo 3' del primer unido a la cadena principal; formando una cadena complementaria, por ende tiene la capacidad de amplificar hebras de ADN a altas temperaturas (Mérien *et al.*, 1992)

2.7 Secuenciamiento:

Los amplicones que se obtienen a partir de la PCR son secuenciados utilizando protocolos estandarizados de secuencia cíclica con BigDye v3.1 y se corren en ABI 3730xl en The Functional Biosciences, Inc, Madison, Wisconsin. Las secuencias obtenidas son analizadas con el programa Mega 5 y se realiza una búsqueda en Blast para encontrar homología con las secuencias en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para obtener un serovar específico.

Con los resultados de la secuenciación se puede determinar que animales son los responsables de la transmisión de la *Leptospira* a los humanos para así mejorar y poder aplicar métodos de control y prevención de la enfermedad.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Localidad de toma de muestras

El presente estudio no probabilístico fue realizado en la parroquia de Calderón del cantón Portoviejo en Junio del año 2009. Esta época fue escogida teniendo en cuenta la reciente pluviosidad y el número de casos humanos.

Se obtuvo muestras de orina de animales domésticos y roedores de domicilios en los que se detectaron casos de leptospirosis durante el año 2008.

Se procuró tomar tres animales de cada especie domestica por localidad y el mayor numero de roedores posible. Se tomaron 90 muestras de orina, 27 (bovino), 27 (porcino), 30 (canino) y 6 muestras de riñón (ratas).

3.2 Recolección de muestras:

Caninos:

Se colectó muestras de orina utilizando furosemida (3.5ml/kg) por vía intravenosa o mediante cistocentesis. Luego de recolectada, la orina fue colocada en un tubo plástico estéril de 25 ml.

Porcinos y Bovinos:

Se inyectó furosemida intravenosa en los bovinos e intramuscular y se colectó la muestra de orina en un tubo plástico estéril de 50 ml en el caso de bovinos y de los porcinos (hembras). En el caso de los machos, se colocó una funda plástica para colectar la orina. Todas las muestras fueron conservadas en hielo para luego ser transportadas al laboratorio de la USFQ y conservadas a $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ratas:

Fueron capturadas en jaulas y sacrificadas con cloroformo. Mediante disección se tomaron los riñones.

3.3 Extracción ADN:

Antes de iniciar el proceso de extracción las muestras de orina fueron centrifugadas a $3287 \text{ X } g$ por 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y el sedimento fue utilizado para extraer ADN.

En el caso de las ratas, 250 mg de riñón fueron cortados en pequeños pedacitos y colocados en un tubo de 1.5ml con 180 μl de ATL. Se adicionó 20

µl de proteinasa K y se incubó a 56 °C hasta que el tejido se encuentre completamente lisado en 1- 3 horas haciendo vortex ocasionalmente. Se adicionó 200 µl de buffer AL a la muestra haciendo vortex nuevamente. Las muestras fueron incubadas a 70 °C por 10 minutos. Se adiciono 200 µl de etanol absoluto realizando vortex nuevamente.

Se utilizó el kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, USA), y se siguió las especificaciones del proveedor (Anexo 3). El ADN fue finalmente diluido en 25 µl de buffer.

3.4 Amplificación de ADN de *Leptospira* en orina utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El protocolo de PCR utilizado se baso en investigaciones previas (Baquero *et al.*, 2010). Se utilizó cuatro primers oligonucleótidos con las siguientes secuencias: A, 5'- GGCGGCGCGTCTITAAACATG-3'; B, 5'- TTCCCCCATTGAGCAAGATT-3' correspondiente a los nucleótidos 38 a 57 y del 348 a 668 correspondientemente; C, 5'-CAAGTCAAGCGGAGTAGCAA-3'; D, 5'-CTTAACCTGCTGCCTCCCGTA-3' correspondientes a los nucleótidos 58 a 77 y 328 a 347 respectivamente del gen 16S rRNA (Mérien F *et al.*, 1992).

La reacción fue constituida de: 1.5mM de MgCl₂, Buffer 1X, 200 µM de cada uno de los nucleotidos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); 2.5 µM de cada primer y, 1.12 unidades de Taq obteniendo un volumen final de 25 µl.

Las reacciones de PCR fueron colocadas en un termociclador (Biometra). La rutina consistió en denaturación inicial a 94°C por 3 minutos, 29 ciclos de amplificación a 94°C por 1 minuto, alineación 63°C por 1.5 minutos y la elongación de la cadena de ADN a 72°C por 2 minutos.

El ADN amplificado fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% a 95 voltios por cuarenta y cinco minutos aproximadamente. El gel se fotografió con una cámara Kodak® con ensamblaje en la oscuridad y las imágenes fueron procesadas con el programa Kodak 1D. Las muestras que mostraban una banda clara fueron amplificadas por segunda vez (Anexo 4).

3.5 Secuenciación

Veinte amplicones fueron enviados a FUNCTIONAL BIOSCIENCES (Madison, Wisconsin EEUU) (Anexo 5). Las secuencias fueron analizadas utilizando el programa MEGA 5 y BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov) (Anexo 6).

4. Resultados

Se analizó mediante la prueba de PCR ochenta y cuatro muestras de orina de animales domésticos y se encontró una positividad de 70% en caninos; 67% en porcinos y 74% en bovinos. Adicionalmente se analizó seis riñones de ratas los cuales fueron positivos en su totalidad (Tabla 1). Se obtuvo secuencias de ADN de 19 amplicones (7 de bovinos, 3 de caninos, 3 de porcinos y 6 de ratas) la gran mayoría de los cuales mostraron alta homología con *L. inadai* 16S rDNA (Tabla 2)

Adicionalmente, 42.85% de los amplicones obtenidos de muestras bovinas, 44% de amplicones provenientes de muestras de porcinos y 26.7% de amplicones de muestras de ratas mostraron homología a *L. borgpetersenii* (Tabla 2).

Las secuencias fueron enviadas al Gen Bank donde fueron asignadas los siguientes códigos:

Dos secuencias de *L. inadai* que presentan diferencias en las bases, MC1 *L. inadai* [Gen Bank: JN377490], MC2 *L. inadai* [Gen Bank: JN377491], y MC3 *L. borgpetersenii* [Gen Bank: JN377492].

Tabla 1: Resultados de PCR por comunidad y por especie animal

Especie	Total de animales	Comunidad	Total muestras analizadas	Muestras por comunidad	Muestras positivas	Porcentaje positivas por comunidad
Caninos		Homiguero	3	3	1	33%
		Bijahual	3	3	3	100%
		El Jobo	3	3	0	0%
		La Balsa	3	3	3	100%
		Potreriillo	2	2	2	100%
		Juan Dalma	3	3	3	100%
		Cienega	3	3	2	67%
		Naranjal	3	3	3	100%
		Forestal	4	4	1	25%
		Santa Clara	3	3	3	100%
Subtotal Caninos	30		30	30	21	70%
Porcinos		Homiguero	3	3	0	0%
		Bijahual	3	3	0	0%
		El Jobo	3	3	0	0%
		La Balsa	3	3	3	100%
		Potreriillo	4	4	4	100%
		Juan Dalma	2	2	2	100%
		Cienega	3	3	3	100%
		Naranjal	3	3	3	100%
		Forestal	3	3	3	100%
Subtotal Porcinos	27		27	27	18	67%
Bovinos		Homiguero	3	3	2	67%
		Bijahual	3	3	1	33%
		El Jobo	2	2	1	50%
		La Balsa	3	3	3	100%
		Potreriillo	3	3	3	100%
		Juan Dalma	4	4	4	100%
		Cienega	3	3	2	67%
		Naranjal	3	3	3	100%
		Forestal	3	3	1	33%
Subtotal bovinos	27		27	27	20	74%
Ratas			6	6	6	100%
Subtotal ratas	6		6	6	6	100%
Total	90		90	90	65	72%

Tabla 2: Positividad de acuerdo a la especie animal

	<i>L. borpetersenii</i>	<i>L. inadai</i>
Bovino	3 (42.85%)	4 (57.14%)
Canino	0 (0%)	3 (100%)
Porcino	1 (33.33%)	2 (66.66%)
Rata	1 (16.66%)	5 (83.33%)
Total	5 (26.31%)	14 (73.68%)

5. Discusión:

El presente estudio demostró una positividad a leptospirosis elevada (72%) en animales domésticos en la zona de Calderón- Portoviejo. Estos datos son inesperados por cuanto este estudio fue llevado a cabo durante la temporada de sequia. Estudios similares llevados a cabo en bovinos en la Sierra ecuatoriana y en el matadero municipal de Quito indican porcentajes bastante menores (22.3%) (Baquero *et al.*, 20010). Estos datos nos sugieren que la diseminación de *Leptospira* es mayor en esta localidad que en otras regiones del país. Estos resultados podrían explicar la frecuente incidencia de brotes de leptospirosis humana en esta región.

La caracterización molecular de los amplicones sugiere que la mayoría de animales domésticos y ratas estuvo eliminando *Leptospira inadai*, una especie categorizada como de patogenicidad intermedia (Fearnley *et al.*, 2007). Estos resultados son similares a los encontrados en bovinos sacrificados en el matadero municipal de Quito en los que también se identificó esta especie de *Leptospira* (Baquero *et al.*, 20010).

La patogenicidad de *L. inadai* es controversial ya que se ha realizado inoculaciones en animales de laboratorio sin que cause infección, aunque existe reportes de enfermedad en humanos (Fearnley *et al.*, 2007) y se han aislado de ratones y monos experimentalmente infectados (Gangadhar *et al.*, 2000). Se inoculó el agente en distintas especies (un mono africano, un mono araña, ocho hámsteres y tres cuyes) y fueron positivos al cultivo y solo un cuy presentó decaimiento e inapetencia (Schmid *et al.*, 1986). También es importante mencionar que estudios de leptospirosis en la zona de Iquitos- Perú demostraron

que otra especie intermedia (*L. liceraceae*) fue la responsable de casos de leptospirosis humana en esta región. Esta bacteria vive en corrientes naturales de agua o ríos por lo tanto se podría creer que se la puede encontrar incidentalmente en animales que viven cerca de aguas contaminadas (Matthias *et al.*, 2008).

Clásicamente se considera que existen distintas cepas de *Leptospira* asociadas a distintas especies animales (*L. interrogans* serovar *canicola* está presente en perros, *L. borgpetersenii* serovar *hardjo* en bovinos, *L. interrogans* serovar *interohaemorrhagiae* en ratas, etc) (Levett, 2001; Bharti *et al.*, 2003). Por esta razón resulta inesperado encontrar *L. inadai* en distintas especies animales. Sin embargo, se ha reportado cepas dominantes que infectan distintas especies animales en regiones de Tailandia e India (Thaipadungpanit *et al.*, 2007; Nalam *et al.*, 2010)

6. Conclusión:

Portoviejo es una zona que a lo largo del tiempo ha presentado la mayor cantidad de casos de leptospirosis en el Ecuador. La carencia de infraestructura sanitaria, la presencia de lluvias y la población de ratas y otros animales portadores hacen a este lugar tener las características ideales para el desarrollo de la enfermedad convirtiéndola en una zona endémica.

El método más sensible de diagnóstico es la PCR, uno de los más utilizados por su costo y eficacia, y, al determinar la presencia de *Leptospira*, la secuenciación ayuda a establecer la epidemiología de la misma.

Se determinó que *L. inadai* es una cepa altamente circulante en animales de comunidades de Calderón y surge la pregunta si los humanos se encuentran infectados con la misma siendo la responsable de los brotes reportados.

Por las condiciones económicas del lugar, el control de la patología es complicado, especialmente si los recursos se desperdician tomando medidas de control innecesarias. Es por esto la necesidad de identificar los animales responsables de la transmisión de la *Leptospira* a humanos, para así distribuir los recursos y fondos necesarios de una manera adecuada.

Durante la presente investigación se capacitó a personal del sub-centro de salud de Calderón con una metodología sencilla y efectiva para la recolección de muestras animales que permitan a futuro el monitoreo de la leptospirosis en esta zona.

7. Recomendaciones

- Es importante realizar un estudio más amplio en las mismas localidades estudiadas, calculando el tamaño de la muestra para cada especie animal para que así los resultados sean estadísticamente significativos.
- Toma de muestras de más roedores de las localidades estudiadas en la presente investigación para tener un dato más significativo de la cepa de *Leptospira* circulante en la zona.
- Se debe tomar muestras de orina de los pacientes febriles de las diez localidades y del agua de ríos de la zona, analizarlas mediante PCR y mandar a secuenciar para saber si *L. inadai* es la cepa responsable de los brotes en humanos.

- Entrenamiento y equipamiento de los laboratorios del ministerio de Salud de Portoviejo para así agilizar el proceso de diagnóstico y tomar las medidas de control necesarias.

- Realizar una campaña de concientización hacia las personas que habitan estas localidades con buenas prácticas de higiene y manejo de los animales.

Bibliografía:

- Acha PN, Zyfres B. "Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales". Organización panamericana de la salud Segunda edición: Publicación científica No. 503. USA. 1986
- Adler B, de la Peña Moctezuma A. "*Leptospira* and leptospirosis". Vet Microbiol 140 (2010): 287-296.
- Agudelo-Flórez P, Restrepo M, Moreno N. "Diagnóstico de leptospirosis de muestras de sangre y cultivo por observación en microscopio de campo oscuro". Biomédica 28 (2008): 7-9.
- Alonso-Andicoberry C, García-Peña F.J, Ortega-Mora L.M. "Epidemiología, diagnóstico y control de la leptospirosis bovina (Revisión)". Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim 16, 2001
- Baquero MI, López N, Mejía ME, Trueba G. Evaluation of a Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Leptospirosis in Cattle". The Open Veterinary Science Journal 4 (2010): 31-35.
- Beran GW, Steele JH. Handbook of zoonoses, Section A: Bacterial, Rickettsial, Chlamidial, and Mycotic. USA: Second edition, 1994.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. Peru-United States Leptospirosis Consortium. "Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance". Lancet Infect Dis 3 (2003): 757-771.
- Blast.ncbi.nlm.nih.gov. 5 Noviembre, 2010. National Library of Medicine. Noviembre 2010. <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>
- Bolin CA. "Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals". Semin Vet Med Surg (Small Anim). 11(1996): 166-171.
- Bomfim MRQ, Barbosa-Stancioli EF, Koury MC. "Detection of pathogenic leptospire in urine from naturally infected cattle by nested PCR". Vet J 178 (2008): 251-256.
- Boqvist S, Ho Thi VT, Magnusson U. "Annual variations in *Leptospira* seroprevalence among sows in southern Vietnam". Tropical Animal Health and Production 37 (2005): 443- 449.
- Braun V, Braun M. "Iron transport and signaling in *Escherichia coli*". FEBS Lett 529 (2002): 78-85.
- Center for Food Security and Public Health Cfsph.iastate.edu.. 1 Mayo, 2005. Octubre, 2010
<<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/leptospirosis.pdf>>

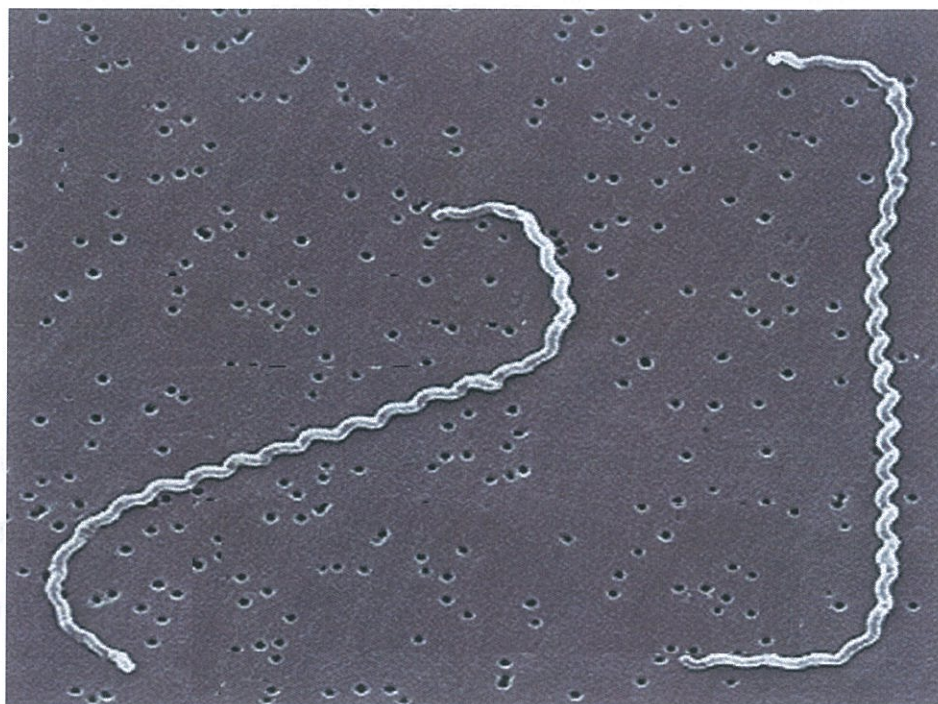
- Cerqueira GM, Picardeau M. "A century of *Leptospira* strain typing". Infect Genet Evol 9 (2009): 760-768.
- De Vasconsuelos L, Ramos M, Otorico E. "Survey of anti *Leptospira* agglutinins in workers from the city of Londrina, Paraná, Brasil". Rev Latinoam Microbiol 35 (1993): 153-157.
- Dirección Provincial de la Salud de Manabí. "Caracterización epidemiológica de la leptospirosis en áreas de riesgo de la parroquia de Calderón del cantón Portoviejo". 2008.
- Dworkin M, Falkow S. "The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Proteobacteria: Delta And Epsilon Subclasses. Deeply Rooting Bacteria". Springer Science. Singapore. 2006.
- Ellis WA, Hovind-Hougen K, Moller S, Birch-Andresen A. "Morphological changes upon subculturing of freshly isolated strains of *Leptospira interrogans* serovar hardjo". Zentralbl. Bakteriologie, Mikrobiologie, Hygiene, A 255 (1983): 323-335.
- Eshghi A, Cullen PA, Cowen L, Zuerner RL, Cameron CE. "Global Proteome Analysis of *Leptospira interrogans*". Journal of Proteome Research 8 (2009): 4564-4578.
- Fearnley C, Wakeley PR, Gallego-Beltran J, Dalley C, Williamson S, Gaudie C, Woodward MJ. "The development of a real-time PCR to detect pathogenic *Leptospira* species in kidney tissue". Res Vet Sci 85 (2008): 8-16.
- Ganoza CA, Matthias MA, Saito M, Cespedes M, Gotuzzo E, Vinetz JM. "Asymptomatic renal colonization of humans in the peruvian Amazon by *Leptospira*". PLoS Negl Trop Dis. 4 (2010): e612.
- Gelosa L, Perone A. "Seroepidemiologic study of human leptospirosis in Lombardy". Boll Ist Sieroter Milan 68 (1989): 127-141.
- Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, Van Eys GJ, Everard CO, Hartskeerl RA, Terpstra WJ. "Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers". J Gen Microbiol 139 (1993): 1691-1700.
- Iwamoto E, Wada Y, Fujisaky Y, Umeki Y, Jones MY, Mizuno T, Itamoto K, Maeda K, Iwatas H, Okuda M. "Nationwide Survey of *Leptospira* Antibodies in Dogs in Japan: Results from Microscopic Agglutination Test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay". J. Vet. Med. Sci 71 (2009): 1191-1199.
- Kaushik SP, Yim HB, Tan CC. "Weils' syndrome and concomitant hepatitis B infection". Singapore Med J 40 (1999): 104-105.

- Koizumi N, Gamage CD, Muto M, Kularatne SA, Budagoda BD, Rajapakse RP, Tamashiro H, Watanabe H. "Serological and genetic analysis of leptospirosis in patients with acute febrile illness in kandy, sri lanka". Jpn J Infect Dis 62 (2009): 474-5.
- Levett PN. "Leptospirosis". Clinical Microbiology Reviews 14 (2001): 296-326.
- Matthias MA, Ricaldi JN, Cespedes M, Diaz MM, Galloway RL, Saito M, Steigerwalt AG, Patra KP, Ore CV, Gotuzzo E, Gilman RH, Levett PN, Vinetz JM. "Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon". PLoS Negl Trop Dis 2 (2008): e213.
- Megasoftware.net. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution. 2011. Noviembre 2010. <<http://www.megasoftware.net/>>
- Mérien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. "Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples". J Clin Microbiol 30 (1992): 2219-2224.
- Mérien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G. "A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis". FEMS Microbiol Lett 249 (2005): 139-147.
- Moreno G. "Informe del trabajo realizado en la asesoria tecnica al Ministerio de Salud Publica al Ecuador, Provincia de Manabí en el enfrentamiento del brote epidémico de Leptospirosis". OPS/Ministerio de Salud de Nicaragua 2008.
- Morey RE, Galloway RL, Bragg SL, Steigerwalt AG, Mayer LW, Levett PN. "Species-Specific Identification of *Leptospiraceae* by 16S rRNA Gene Sequencing". Journal of clinical microbiology 44 (2006): 3510-3516.
- Nalam K, Ahmed A, Devi SM, Francalacci P, Baig M, Sechi LA, Hartskeerl RA, Ahmed N. "Genetic affinities within a large global collection of pathogenic *Leptospira*: implications for strain identification and molecular epidemiology". PLoS One 5 (2010): e12637.
- Narita M, Fujitani S, Haake DA, Paterson DL. "Leptospirosis after recreational exposure to water in the Yaeyama islands, Japan". Am J Trop Med Hyg 73 (2005): 652-656.
- Pereira MM, Andrade J. "Human leptospirosis in a slum area in the city of Rio de Janeiro, Brazil--a serological and epidemiological study". Mem Inst Oswaldo Cruz 85 (1990): 47-52.

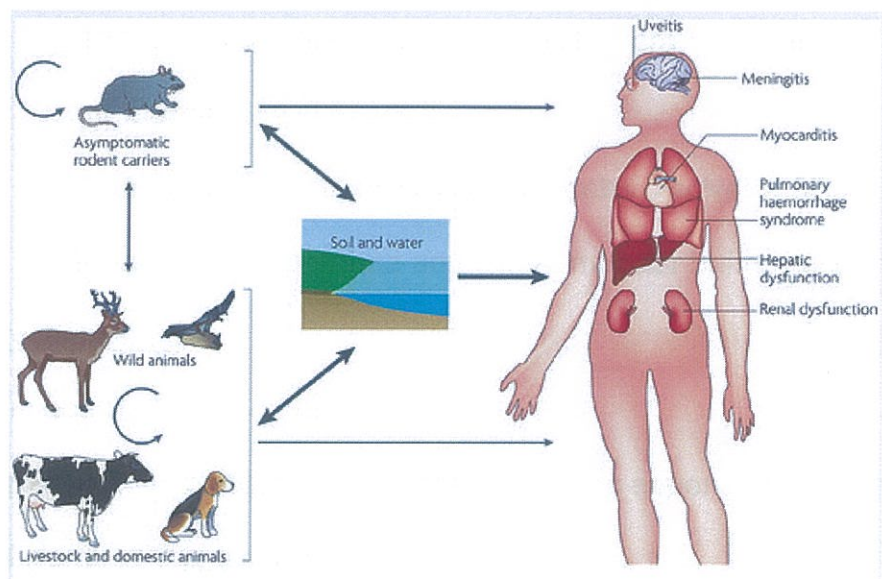
- Priya CG, Hoogendijk KT, Berg MVD, Rathinam SR, Ahmed A, Muthukkaruppan VR, Hartskeerl RA. "Field rats form a major infection source of leptospirosis in and around Madurai, India". J Postgrad Med 53 (2007): 236- 240.
- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC, Maghire D. Veterinary and Microbial Disease. Blackwell Science, 2002
- Rentko VT, Clark N, Ross LA, Schelling SH. "Canine leptospirosis. A retrospective study of 17 cases". J Vet Intern Med 6 (1992): 235-244.
- Roca, B. "Leptospirosis". Rev Med 50 (2006): 3-6.
- Sambrook J, MacCallum P. "Molecular Cloning: A laboratory manual". Cancer Institute, Melbourne, Australia, and David Russell, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas., 3rd ed. 2001
- Schmid GP, Steere AC, Kornblatt AN, Kaufmann AF, Moss CW, Johnson RC, Hovind-Hougen K, Brenner DJ. "Newly recognized *Leptospira* species ("*Leptospira inadai*" serovar lyme) isolated from human skin". J Clin Microbiol 24 (1986): 484-6.
- Smith CE, Turner LH. "The effect of pH on the survival of leptospires in water". Bull World Health Organ 24 (1961): 35-43.
- Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Chierakul W, Smythe LD, Petkanchanapong W, Limpaboon R, Apiwatanaporn A, Slack AT, Suputtamongkol Y, White NJ, Feil EJ, Day NP, Peacock SJ. "A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand". PLoS Negl Trop Dis 1 (2007): e56.
- Thornley CN, Baker MG, Weinstein P, Maas EW. "Changing epidemiology of human leptospirosis in New Zealand". Epidemiol Infect 128 (2002): 29-36.
- Van CT, Thuy NT, San NH, Hien TT, Baranton G, Perolat P. "Human leptospirosis in the Mekong delta, Viet Nam". Trans R Soc Trop Med Hyg. 92 (1998): 625-628.
- Vinetz, J. M. "Leptospirosis". Curr. Opin. Infect. Dis. 14 (2001): 527-538.
- Virginie M, Branger C, Andre-Fontaine G. "Epidemiology of leptospirosis". Rev Cubana Med Trop. 54 (2002): 7-10.
- World Health Organization. Human "Leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control". 2003.
- Xue F, Yan J, Picardeau M. "Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned from the genomes". Microbes Infect. 11 (2009): 328-333.

Yuri K, Takamoto Y, Okada M, Hiramune T, Kikuchi N, Yanagawa R. "Chemotaxis of leptospire to hemoglobin in relation to virulence". Infect Immun. 61 (1993): 2270-2272.

Anexos:



Anexo 1: Micrografía por barrido de electrones de *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae (Levet, 2001)



Anexo 2: Epidemiología de la Leptospirosis

Anexo 3: Extracción ADN

QIAamp DNA Mini KTIT (250 determinaciones)

Cat No 51306

Almacenar a temperatura ambiente

Lote No 127146769

Antes de iniciar

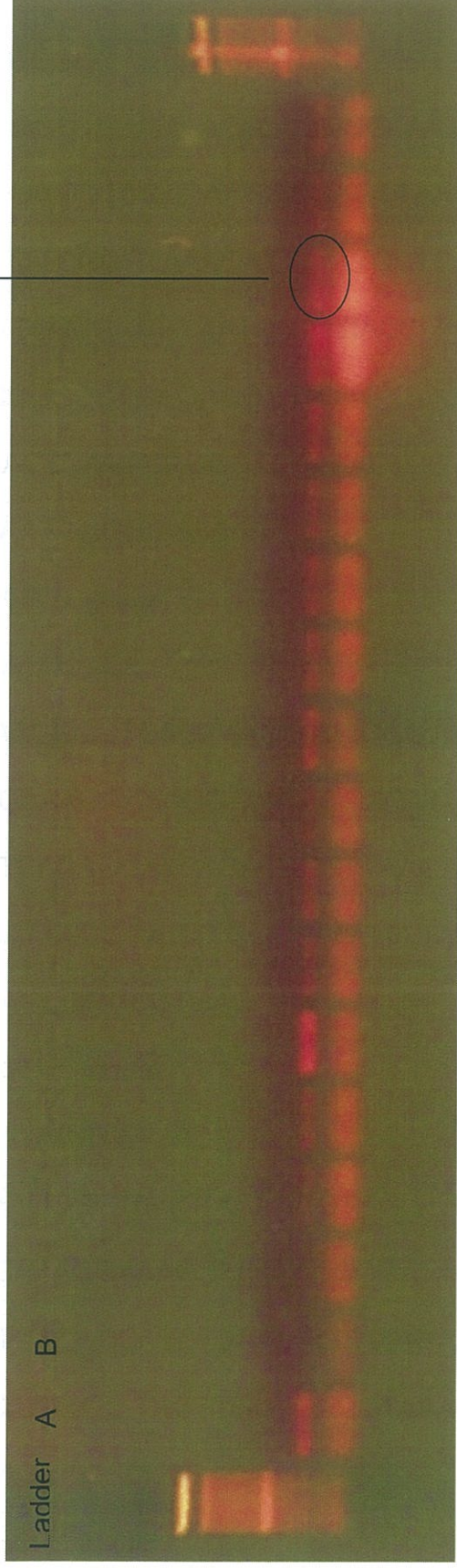
1. Atemperar el baño de arena a 56 ° C
2. Equilibrar el buffer y el agua a temperatura ambiente para la emulsión
3. Preparar los reactivos AW1, Buffer AW2, Proteasa con las siguientes instrucciones:
 - a. Buffer AW1 (guardar a temperatura ambiente) antes de usar la primera vez hay que añadir 125 ml de etanol absoluto para un volumen final de 220 ml. Cerrar bien el frasco.
 - b. Buffer AW2 (guardar a temperatura ambiente): antes de usar adicionar 160 ml de etanol absoluto para un volumen final de 226 ml. Cerrar bien el frasco.
 - c. Si el buffer AL esta precipitado se debe disolver a 56 ° C. Buffer AL (guardar a temperatura ambiente): mezclar buffer frecuentemente.

Procedimiento

1. Se necesita 200 µl de muestra
2. Pipetear 20 µl proteasa en la base de un tubo eppendorf para centrifuga
3. Adicionar 200 µl de la muestra.
4. Adicionar 200 µl del Buffer AL a la muestra y hacer vortex fuerte por 15 segundo
5. Incubar a 56°C por 10 minutos.

6. Centrifugar brevemente el tubo.
7. Adicionar 200 μ l de etanol absoluto y realizar vortex por 15 segundos.
8. Cuidadosamente poner la solución sobre una columna QIAamp Spin Column que se encuentra sobre un tubo de 2 ml. Tener cuidado de no mojar el borde del tubo.
9. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.
10. Colocar la columna en un tubo nuevo de 2 ml y se adicionar 500 μ l de Buffer AW1 sin mojar el borde del tubo.
11. Centrifugar a 8000rpm durante 1 minuto, volver a botar el filtrado y colocar nuevamente otro tubo de 2 ml.
12. Abrir la columna y colocar 500 μ l del Buffer AW2 sin mojar el borde del tubo.
13. Centrifugar a máxima velocidad a 14,000 rpm por 3 minutos.
14. Poner en un nuevo tubo la columna y descartar el filtrado.
15. Centrifugar a 14000 rpm durante 1 minuto.
16. Por último, colocar la columna en un tubo de 1.5 ml y se adicionar 50 μ l del Buffer AE o agua destilada e incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.
17. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto
18. Dividir lo filtrado en alícuotas de 25 μ l y guardarlas a -20°C hasta ser utilizadas.

Muestra de AND amplificado de *Leptospira*



Anexo 4: amplificación de ADN de *Leptospiras* patógenas utilizando primers CD. En la columna A se observa una banda con un tamaño aproximado de 300bp, que indica la amplificación de ADN del control *L. inadai*, lo cual revela que los primers CD funcionan correctamente. La columna B es el control negativo en cual se colocó agua.

Anexo 5: Secuencias limpias de *Leptospira*Secuencia 52: *L. borgpetersenii*

CTTGGCGGCGCGTCTTAAACATGCAAGTCAAGCGGAGTAGCAATACTCAGC
 GGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTTCCTCCGAGT-
 CTGGGATAACTTTCCGAAAGGGGAGCTAATACTGGATAGTCCCGAGAGATCA
 NAGGATTTTTTCGGGTAAAGATTTATTGCTCGGAGATGAGCNCGCGCCCGATT
 AGCTA-GTTGGTGAGGTAATGGCTCACC--AAGGCGAC-GAT-
 CGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTTT-GGCCA-
 CAATGGAAGTGAACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAAGAAT
 CTTGCTCAATGGGGGGAAAA

Secuencia 65: *L. inadai*

AGTAGCAATACCTA-
 GCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTTCCTCCGAGTCTGGGATA
 ACTCTCCGAAAGGAAAGCTAATACCGGATAGTCC--
 TACTGGATCACAGGATCTGATAGGTAAAGATTTATTGCTTGGAGATGAGCCC
 GCGTCTGATTAGC-TAGTTGGCGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGAC-
 GATCCGTAGCGGGCCTGAG-

Secuencia 66: *L. inadai*

AGTAGCAATACCTA-
 GCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTTCCTCCGAGTCTGGGATA
 ACTTTCCGAAAGGAAAGCTAATACCGGATAGTCC--
 TACTGGATCACAGGATCTGATAGGTAAAGATTTATTGCTTGGAGATGAGCCC
 GCGGCCGATTAGC-TAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGAC-
 GATCCGTAGCCGGCCTGAG-

Secuencia 69: *L. inadai*

AGTAGCAATACCTA-

GCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTTCCTCCGAGTCTGGGATA

ACTTTCCGAAAGGAAAGCTAATACCGGATAGTCC--

TACTGGATCACAGGATCTGATAGGTAAAGATTTATTGCTTGGAGATGAGCCC

GCGGCCGATTAGC-TAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGGC-

GATCGGTAGCCGGCCTGAG-

Secuencia 74: *L. borgpetersenii*

TGGCGGCGCGTCTTAAACATGCAAGTCAAGCGGAGTAGCAATACTCAGCGG

CGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTTCCTCCGAGTCTGGGATAACTTT

CCGAAAGGNGAGCTAATACNGGATAGTCCCNAGAGNTCACAGGATTTTNNN

GGTAAANATTTATTGCTCGGAGATGAGCCCGCGNCCGATTAGCTAGTTGGTG

AGGTAATGGCT-CACCAAGGCGAC-GAT-CGGTAGCCGGCCTGA-

GAGGGTGTNCGGCCACAATGGAAGTGA-

GACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAAGAATCTTGCTCA

Secuencia 76: *L. borgpetersenii*

TGGCGGCGCGTTCTTAAACATGCAAGTCAAGCGGAGTAGCAATACTCAGCG

GCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTTCCTCCGAGTCTGGGATAACTT

TCCGAAAGGNGAGCTAATACTGGATAGTCCCNNTNGGTCATAGGATNTTNCN

GGTAAAGATTTATTGCTCGGAGATGAGCCCGCGCCCGATTAGCTAGTTGGTG

AGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTTC

GGCCACA-

ATGGAAGTGAAGACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAAGAATCT

TGCTCAATGGGGG

Secuencia 77: *L. borgpetersenii*

TGGCGGCGCGTTCTTAAACATGCAAGTCAAGCGGAGTAGCAATACTCAGCG
 GCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTTCCTCCG-
 AGTCTGGGATAACTTTCC--GAAAGGGGAGCTAATACNGG-
 ATAGTCCCGAGAGGTCACAGGATTTTTCGGGGTAAAGATTTATTGCTCGGAG
 ATGAGCCCGCGCCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCG
 AC-GAT-CGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTTCCGGCCA-
 CAATGGAAGTGAACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAAGAAT
 CTTGCTCAATG

Secuencia 78: *L. inadai*

AGTAGCAATACCTA-
 GCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTTCCTCCGAGTCTGGGATA
 ACTTTCCGAAAGGAAAGCTAATACCGGATAGTCC--
 TACTGGATCACAGGATCTGATAGGTAAAGATTTATTGCTTGGAGATGAGCCC
 GCGGCCGATTAGC-TAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGAC-
 GATCGGTAGCCGGCCTT---

Secuencia 112: *L. inadai*

AGTAGCAATACCTA-
 GCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTTCCTCCGAGTCTGGGATA
 ACTTTCCGAAAGGAAAGCTAATACCGGATAGTCC--
 TACTGGATCACAGGATCTGATAGGTAAAGATTTATTGCTTGGAGATGAGCCC
 GCGGCCGATTAGC-TAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGAC-
 GATCGGTAGCCGGCCTGAG-

Secuencia 91: *L. inadai*

AGTAGCAATACCTA-
 GCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTTCCTCCGAGTCTGGGATA

ACTTTCCGAAAGGAAAGCTAATACCGGATAGTCC--

TACTGGATCACAGGATCTGATAGGTAAAGATTTATTGCTTGGAGATGAGCCC

GCGGCCGATTAGC-TAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGAC-

GATCGGTAGCCGGCCTGAG-

Secuencia 93: *L. inadai*

AGTAGCAATACCTA-

GCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTTCCTCCGAGTCTGGGATA

ACTTTCCGAAAGGAAAGCTAATACCGGATAGTCC--

TACTGGATCACAGGATCTGATAGGTAAAGATTTATTGCTTGGAGATGAGCCC

GCGGCCGATTAGC-TAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGAC-

GATCGGTAGCCGGCCTGAG-

Secuencia 95: *L. inadai*

AGTAGCAATACCTA-

GCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTTCCTCCGAGTCTGGGATA

ACTTTCCGAAAGGAAAGCTAATACCGGATAGTCC--

TACTGGATCACAGGATCTGATAGGTAAAGATTTATTGCTTGGAGATGAGCCC

GCGGCCGATTAGC-TAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGAC-

GATCGGTAGCCGGCCTGAG-

Secuencia 117: *L. inadai*

AGTAGCAATACCTA-

GCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTTCCTCCGAGTCTGGGATA

ACTTTCCGAAAGGAAAGCTAATACCGGATAGTCC--

TACTGGATCACAGGATCTGATAGGTAAAGATTTATTGCTTGGAGATGAGCCC

GCGGCCGATTAGC-TAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGAC-

GATCGGTAGCCGGCCTGAG-

Secuencia 118: *L. inadai*

AAGTCAAGCGGAGTAGCAATACCTAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGG
GTAATCTTCCTCCGAGTCTGGGATAACTTTCCGAAAGGAAAGCTAATACCGG
ATAGTCCTACTGGATACAGGATCTGATAGGTAAAGATTTATTGCTTGGAGATG
AGCCCGCGGCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACG
ATCGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCCGGCCACAATGGAAGTCTGAGACACG
GTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAG

Secuencia 119: *L. inadai*

AGTAGCAATACCTA-
GCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTTCCTCCGAGTCTGGGATA
ACTTTCCGAAAGGAAAGCTAATACCGGATAGTCC--
TACTGGATCACAGGATCTGATAGGTAAAGATTTATTGCTTGGAGATGAGCCC
GCGGCCGATTAGC-TAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGAC-
GATCGGTAGCCGGCCTGAG-

Secuencia 120: *L. inadai*

AGTAGCAATACCTA-
GCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTTCCTCCGAGTCTGGGATA
ACTTTCCGAAAGGAAAGCTAATACCGGATAGTCC--
TACTGGATCACAGGATCTGATAGGTAAAGATTTATTGCTTGGAGATGAGCCC
GCGGCCGATTAGC-TAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGAC-
GATCGGTAGCCGGCTCGAG-

Secuencia 121: *L. inadai*

GATAGTAAGATTTATT----GCTTGAGATGAGCC-
CCGGCTGATTAGCTAGTTGGCG---AGGTAAAGGCTCACCAAGGCGAC--

