



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO EXPERIMENTAL:

**OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN
MOLECULAR MEDIANTE ENSAYOS QPCR DE LEPTOSPIRA SPP. EN
DIFERENTES VECTORES DE LA PROVINCIA DEL GUAYAS**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología.

AUTORES:

MARTÍNEZ ÁVILA KAROLEN LIESÉL
MONTIEL FRIEND IVÁN ANDREE

TUTORES:

ING. MARÍA ALEJANDRA DE LA CRUZ MORA MSC.
ING. NAOMI DANIELA MORA JARAMILLO.

GUAYAQUIL - ECUADOR

2023

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Karolen Liesél Martínez Ávila con documento de identificación N° 1727212118 e Iván Andree Montiel Friend con documento de identificación N° 0924007305; manifestamos que: Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

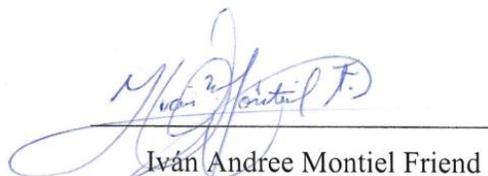
Guayaquil, 7 de septiembre del 2023

Atentamente,



Karolen Liesél Martínez Ávila

C.I. 1727212118



Iván Andree Montiel Friend

C.I. 0924007305

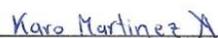
**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, Karolen Liesél Martínez Ávila con documento de identificación No. 1727212118 e Iván Andree Montiel Friend con documento de identificación No. 0924007305, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del: OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR MEDIANTE ENSAYOS QPCR DE LEPTOSPIRA SPP. EN DIFERENTES VECTORES DE LA PROVINCIA DEL GUAYAS, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

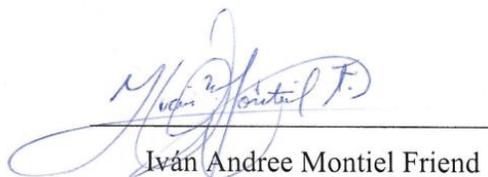
Guayaquil, 7 de septiembre del 2023

Atentamente,



Karolen Liesél Martínez Ávila

C.I. 1727212118



Iván Andree Montiel Friend

C.I. 0924007305

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, María Alejandra de la Cruz Mora con documento de identificación N° 1003233689, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR MEDIANTE ENSAYOS QPCR DE LEPTOSPIRA SPP. EN DIFERENTES VECTORES DE LA PROVINCIA DEL GUAYAS, realizado por Karolen Liesél Martínez Ávila con documento de identificación N° 1727212118y por Iván Andree Montiel Friend con documento de identificación N° 0924007305, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción *Proyecto de Investigación – Institución externa* que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 7 de septiembre del 2023

Atentamente,



María Alejandra de la Cruz Mora, MSc.

C.I. 1003233689

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Naomi Daniela Mora Jaramillo con documento de identificación N°0927529990, investigadora y profesional técnico del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) “Dr. Leopoldo Izquieta Pérez”, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR MEDIANTE ENSAYOS QPCR DE LEPTOSPIRA SPP. EN DIFERENTES VECTORES DE LA PROVINCIA DEL GUAYAS, realizado por Karolen Liesél Martínez Ávila con documento de identificación N° 1727212118 y por Iván Andree Montiel Friend con documento de identificación N° 0924007305, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción *Proyecto de Investigación – Institución Externa* que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 7 de septiembre del 2023

Atentamente,



Firmado digitalmente por:
NAOMI DANIELA
MORA JARAMILLO

Ing. Naomi Daniela Mora Jaramillo

C.I. 0927529990

AGRADECIMIENTO

Expresamos nuestra más profunda gratitud a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de este trabajo de investigación. Sus contribuciones, apoyo y aliento han sido fundamentales para llegar a este punto.

En primer lugar, deseamos agradecer a nuestros asesores académicos, Ing. Alejandra de la Cruz y Lcda. Brenda López, por su orientación experta, paciencia y dedicación a lo largo de este proceso. Sus valiosos consejos y comentarios enriquecieron enormemente nuestro enfoque y metodología de investigación. Agradecemos sinceramente a todos los profesores de la Universidad Politécnica Salesiana por su labor en la formación académica y su inspiración constante. Sus conocimientos compartidos en las aulas y durante las discusiones informales nos han brindado una perspectiva más profunda y significativa sobre el tema de esta tesis.

Un agradecimiento especial se extiende a los expertos externos que generosamente compartieron su experiencia y conocimientos, Ing. Rosa Vega, PhD. Alberto Orlando, Arianna León, Vet. Joselyn Calderón e Ing. Naomi Mora, quienes fueron fundamentales al proporcionar ideas valiosas y perspicaces durante las entrevistas y las conversaciones que tuvieron lugar a lo largo de este proyecto. Nuestro agradecimiento se extiende a la Institución Nacional de Investigación en Salud Pública por brindar los recursos y el entorno propicio para llevar a cabo esta investigación. Su compromiso con la promoción de la investigación y el avance en el campo de la salud pública ha sido una fuente constante de inspiración y motivación a lo largo de este proceso. Agradecemos el apoyo brindado por la institución, en especial a la Lcda. Esther Carlín, puesto que, gracias a su gestión y apoyo, han permitido que este trabajo alcance sus objetivos y contribuya al conocimiento en nuestra área.

Finalmente, dedicamos este trabajo a nuestros padres y familiares, cuyo amor incondicional y aliento constante nos han impulsado en cada etapa de nuestra educación. Su apoyo ha sido fundamental en nuestro camino hacia la consecución de este logro académico.

En resumen, a todas las personas mencionadas y a aquellas que, aunque no estén nombradas, contribuyeron de alguna manera, les expresamos nuestro más sincero agradecimiento. Este trabajo no habría sido posible sin su valiosa contribución.

DEDICATORIA

En reconocimiento a quienes han sido mi guía y apoyo a lo largo de este camino, dedico esta tesis a la incansable búsqueda del conocimiento y al esfuerzo que hizo posible este logro.

Martinez Avila K.

RESUMEN

La leptospirosis, una patología zoonótica originada por microorganismos bacterianos del género *Leptospira*, constituye una infección de alto impacto para la salud de los seres humanos, causando complicaciones crónicas renales, con una estimación de incidencia anual de un caso por cada 100.000 personas a nivel nacional, con 547 casos notificados entre 2016 y 2020, en especial las provincias costeras. Por lo cual, es fundamental que los Institutos de vigilancia y epidemiología, cuenten con protocolos optimizados para su detección oportuna.

La presente investigación tiene como propósito estandarizar y optimizar el protocolo para la detección de la enfermedad mediante la técnica qPCR, contribuyendo a que el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública disponga de técnicas validadas para detectar la enfermedad en sus diferentes estadios y prevenir complicaciones futuras en la población. Para el análisis, se emplearon muestras de orina y sangre provenientes de los vectores capturados en áreas de la provincia del Guayas donde se habían registrado brotes de leptospirosis. Se procedió a la comparación de distintos kits de extracción de ADN, así como a la evaluación de diversos conjuntos de protocolo, conocidos como "Master mix", en los cuales se varió el volumen utilizado para identificar el ensayo qPCR más factible.

Los resultados obtenidos evidenciaron que el procedimiento de extracción de ADN conforme el kit comercial denominado *Qiagen DNeasy® Blood & tissue kit*, fue el que permitió obtener la mayor concentración de ADN extraído a comparación con los otros tratamientos. Adicionalmente, se seleccionó la *Master mix* para llevar a cabo la detección de *Leptospira* spp denominado, *Promega GoTaq®*, debido a que amplificó todos los controles correspondientes. A partir de estos resultados, se concluyó que el ensayo qPCR resultó específico para la identificación de *Leptospira* spp., sin generar amplificación del ADN correspondiente a otras bacterias relacionadas.

Palabras clave: *bacteria, ADN, leptospirosis, sensibilidad, especificidad, amplificación.*

ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonotic disease caused by bacterial microorganisms of the genus *Leptospira*, constitutes a high-impact infection for human health, causing chronic renal complications, with an estimated annual incidence of one case per 100,000 people nationally, with 547 cases reported between 2016 and 2020, primarily in coastal provinces. Therefore, it is essential for surveillance and epidemiology institutes like INSPI to have optimized protocols for timely detection.

This research standardizes and optimizes the protocol for disease detection using the qPCR technique, contributing to the availability of validated techniques at the National Institute of Public Health Research for detecting the disease at its different stages and preventing future complications in the population. Blood and urine samples from captured vectors in areas of the Guayas province with leptospirosis outbreaks were used for analysis. Different DNA extraction methods were compared, and various protocol sets, known as "Master mix," were evaluated, varying the volume used to identify the most feasible qPCR assay.

The results showed that the DNA extraction procedure based on the commercial kit *Qiagen DNeasy® Blood & tissue kit* yielded the highest concentration of extracted DNA compared to other treatments. Additionally, the *Master mix* selected for *Leptospira* spp. detection, named *Promega GoTaq®*, amplified all corresponding controls. From these results, it was concluded that the qPCR assay was specific for the identification of *Leptospira* spp., without amplifying DNA from other related bacteria.

Key words: *bacteria, DNA, leptospirosis, sensitivity, specificity, amplification.*

Índice

Capítulo 1	1
1.1. Introducción	1
1.2. Planteamiento del problema	2
1.2.1. Justificación y delimitación	2
1.3. Objetivos	3
1.3.1. Objetivo general	3
1.3.2. Objetivos específicos	3
1.4. Hipótesis.....	3
Capítulo 2	4
Marco teórico	4
2.1. Género <i>Leptospira</i> spp.	4
2.1.1. Morfología	5
2.1.2. Taxonomía y clasificación.....	6
2.2. La Leptospirosis	10
2.2.1. Afecciones a la salud poblacional.....	10
2.2.2. Epidemiología.....	11
2.2.3. Transmisión	14
2.2.4. Aspectos clínicos	16
2.3. Diagnóstico microbiológico	18
2.3.1. Aislamiento.....	20
2.4. Diagnóstico serológico.....	20
2.5. Diagnóstico a nivel molecular.....	22
2.5.1. Extracción de ADN de muestras biológicas mediante kit comercial	23
2.5.2. Reacción en cadena de la polimerasa - Tiempo real (qPCR)	23
Capítulo 3	26
Marco metodológico	26

3.1.	Obtención de la muestra.....	26
3.2.	Extracción y cuantificación de ADN para muestras biológicas.....	26
3.2.1.	Análisis estadístico.....	30
3.3.	Extracción y cuantificación de ADN para control positivo: serovares de <i>Leptospira</i> spp.	30
3.4.	Ensayos qPCR para estandarización de protocolo.....	31
3.4.1.	Controles internos y controles positivos.....	31
3.4.2.	Muestras biológicas.....	35
3.4.3.	Análisis estadístico.....	37
	Capítulo 4.....	37
	Resultados y discusión.....	37
4.1.	Cuantificación de ADN extraído por kits comerciales.....	37
4.2.	Amplificación de los controles por técnica qPCR.....	38
4.3.	Pruebas Plip32 y P16s con muestras biológicas de sangre.....	40
4.4.	Optimización de protocolo qPCR optimizado.....	42
	Capítulo 5.....	43
	Conclusiones y recomendaciones.....	43
5.1	Conclusiones.....	43
5.2	Recomendaciones.....	44
	Bibliografía.....	45
	Anexos.....	54

Índice de tablas

Tabla 1. Características morfológicas de la <i>Leptospira</i> spp.	5
Tabla 2. Taxonomía de <i>Leptospira</i> spp.	6
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>Leptospira</i> spp.	7
Tabla 4. Serovares definidos en diferentes especies <i>Leptospiras</i> , según	8
Tabla 5. Tipos de diagnósticos directos con su respectiva descripción y ejemplos	18
Tabla 6. Tipos de diagnósticos indirectos con su respectiva descripción y ejemplos	19
Tabla 7. Tratamientos según el tipo de muestra para la extracción de ADN.....	27
Tabla 8. Ensayos para estandarización de protocolo qPCR con controles positivos.....	31
Tabla 9. Componentes y concentraciones de master mix y muestra de ADN para ensayos qPCR con volumen 20uL	33
Tabla 10. Fases y condiciones de qPCR para los ensayos y pruebas	33
Tabla 11. Componentes y concentraciones de master mix y muestra de ADN para ensayos qPCR con volumen de 10uL.....	35
Tabla 12. Resultados de ensayos según los kits comerciales designados con variables categóricas binarias.....	39
Tabla 13. Estadísticos descriptivos para los resultados de las pruebas PLip32 y P16s con muestras biológicas	42

Índice de figuras

Figura 1. Leptospira spp. observada con microscopía electrónica	5
Figura 2. Ciclo de transmisibilidad de la infección bacteriana - leptospirosis.	15
Figura 3. Placa de pocillos múltiples usada para ensayos moleculares	24
Figura 4. Distribución de las muestras biológicas de sangre, divididas en tres secciones para sus réplicas con controles positivos y negativos. CN: Control Negativo; GRI: Control Grippotyphosa; IC: Control Icterohaemorrhagiae; #Muestra "S": Sangre	36
Figura 5. Gráfico de barras de tratamientos para Extracción y cuantificación de ADN	38
Figura 6. Gráficos circulares de porcentajes para las pruebas de amplificación con muestras biológicas	41
Figura 8. Protocolo estandarizado para la identificación de Leptospiras patógenas	42
Figura 7. Protocolo estandarizado para detección de Leptospiras patógenas	43
Figura 9. Curvas de fluorescencia vs Número de ciclos del canal FAM para el gen Lip32 - Triplex prueba PLip32.....	60
Figura 10. Curvas de fluorescencia vs Número de ciclos del canal HEX para el gen secY - Triplex prueba PLip32.....	60
Figura 11. Curvas de fluorescencia vs Número de ciclos del canal CY5 para el gen b-actina - Triplex prueba PLip32.....	61
Figura 12. Curvas de fluorescencia vs Número de ciclos del canal CY5 para el gen b-actina - Triplex prueba P16s.....	61
Figura 13. Curvas de fluorescencia vs Número de ciclos del canal HEX para el gen secY - Triplex prueba P16s.....	62
Figura 14. Curvas de fluorescencia vs Número de ciclos del canal FAM para el gen rrs 16s - Triplex prueba P16s.....	62
Figura 15. Tubos recolectores y columnas giratorias para extracción de ADN	64
Figura 16. Fluorímetro Quantus™ Fluorometer con su NGS Starter Package para cuantificación de ADN	64
Figura 17. Termociclador LightCycler® 480 II con su software de manejo respectivo	65
Figura 18. Kit de extracción Invitrogen PureLink® Genomic DNA MiniKit.....	65
Figura 19. Kit de extracción Wizard® SV Genomic DNA Purification System.....	66
Figura 20. Kit de extracción QIAGEN® DNeasy® Blood & Tissue Kit.....	66

Figura 21. Master mix ensayo 1 (E1) EXPRESS® qPCR SuperMix.....	67
Figura 22. Master mix ensayo 2 (E2) Fast Advanced® NO UNG	67
Figura 23. Master mix para ensayos: E3, E4, E5 GoTaq® MasterMix.....	68

Índice de anexos

Anexo 1. Resultados de cuantificaciones de ADN de serovares <i>Leptospira</i> spp.....	54
Anexo 2. Resultados de cuantificaciones de ADN para muestras biológicas sanguíneas y de orina con diferentes kits comerciales	55
Anexo 3. Características de primers y sondas empleadas para estandarización de protocolo qPCR	57
Anexo 4. Resultados de CT de Tratamientos aplicados con muestras biológicas de sangre	58
Anexo 5. Resultados obtenidos con el programa estadístico InfoStat, versión 2020	63
Anexo 6. Kits comerciales de extracción de ADN y equipos para detección molecular disponibles en INSPI.....	64
Anexo 7. Kits de Master mix utilizados para ensayos qPCR disponibles en INSPI, utilizados en el trabajo experimental.....	67
Anexo 8. Obtención de ADN realizado en el Área de extracción y purificación del Laboratorio de Investigaciones Multidisciplinarias – INSPI	69

Capítulo 1

1.1. Introducción

La infección bacteriana provocada por *Leptospiras*, también llamada leptospirosis es una afección de origen animal, presente alrededor del mundo, cuyas especies de *Leptospira* patógenas están organizadas en un total de 64 serogrupos, de los cuales, 17 de ellos se clasifican, según su filogenia, como patógenos; 21 como intermedios y 23 no definidos (Cilia et al., 2020). Es una enfermedad resurgente infecciosa, tanto en áreas tropicales como subtropicales, donde el entorno propicia la persistencia y propagación, se conoce que más de 150 especies de mamíferos pueden albergar *Leptospira* spp., tomando en cuenta a los roedores como el huésped principal de sostenimiento, varios análisis han demostrado que numerosos mamíferos, tales como las especies de mustélidos y erizos, pueden ser infectados por *Leptospiras* patógenas (Holzapfel et al., 2021).

Las excreciones urinarias de vectores hospederos contagiados con la bacteria, como roedores y animales domésticos, permanecen por largos períodos de tiempo en diversas fuentes hídricas, provocando afectaciones por contacto directo con diferentes especies de mamíferos, en particular en seres humanos, causando una afectación crónica de los túbulos renales mientras las especies infectadas permanecen asintomáticas o presentan una enfermedad aguda (Holzapfel et al., 2021). El sitio central de localización de *Leptospira* es el riñón, lo que da como resultado la propagación al entorno de la bacteria a través de la orina y contagio en una amplia gama de animales de reservorio salvajes y domésticos como por ejemplo canes, felinos y roedores (Cilia et al., 2020).

Las técnicas de detección a nivel molecular utilizadas en la presente investigación, permiten la identificación concisa y preliminar de dicho género bacteriano. La Reacción en cadena de la Polimerasa – Tiempo Real (qPCR) es una variante de los tipos de amplificación de Ácido desoxirribonucleico (ADN) empleando PCR, dado que posibilita la identificación y la cuantificación de muestras de ADN amplificadas en tiempo real, siendo así, una técnica de sensibilidad alta y específica, utilizada para la identificación de un sinnúmero de afectaciones bacterianas de sumo peligro, incluyendo la leptospirosis (Jaimes Camargo & Molina Puentes, 2022).

Este trabajo experimental tiene como propósito optimizar un ensayo de diagnóstico molecular en base a la amplificación de material genético, mediante ensayos moleculares qPCR y aportar con un diagnóstico preciso, de la especie mencionada en diferentes vectores hospedadores.

1.2. Planteamiento del problema

La presencia de la leptospirosis en Ecuador, en específico la provincia del Guayas registra un aumento significativo durante los últimos meses, tomando en cuenta que en la actualidad, la situación epidemiológica ha registrado más de 54 casos desde marzo del 2023, y que permanecen en vigilancia en lo que transcurre del año 2023, lo que categoriza esta enfermedad como un riesgo de prioridad alta para la población ecuatoriana según el Ministerio de Salud Pública, (2023).

El Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) es la entidad encargada de la vigilancia epidemiológica y estudios moleculares de la leptospirosis, como centro nacional de referencia establecido, cuentan con protocolos básicos con una moderada sensibilidad para el diagnóstico de la enfermedad antes mencionada y los kits de marcas comerciales que el laboratorio maneja, deben validarse con un análisis de eficacia del volumen total de la reacción para poder garantizar los resultados mediante ensayos PCR – Tiempo Real (qPCR) y optimizar el uso sus kits comerciales con sus respectivos reactivos para cada procedimiento involucrado en la investigación de la infección bacteriana que afecta a la población ecuatoriana. Esto implica partir de un proceso eficiente procesamiento de muestras biológicas mediante extracción de ADN hasta su posterior amplificación qPCR, logrando una identificación acertada del agente bacteriano patógeno presente en muestras biológicas orientadas para la detección de la afección.

1.2.1. Justificación y delimitación

El trasfondo actual y epidemiológico de leptospirosis reportado, implica una alta incidencia de casos en Guayas, provincia de la costa ecuatoriana (Ministerio de Salud Pública, 2023). Esto genera una demanda de múltiples investigaciones en el ámbito de la salud que permitan una

identificación molecular, rápida y optimizada de *Leptospiras* en muestras de diferentes vectores para evitar futuros contagios en la comunidad (Flores et al., 2020). Con el propósito de contar con métodos eficientes y viables para detección de *Leptospiras*, definir procedimientos de bajo riesgo para los laboratoristas y prevenir futuros brotes de la leptospirosis, la estandarización de un protocolo qPCR de detección molecular para *Leptospiras* patógenas es indispensable, lo cual representa una administración óptima de recursos con reactivos, logrando así la obtención de un método replicable y reproducible que logre el análisis de diferentes tipos de muestras, conservando la pureza en su totalidad posible, de la secuencia que se busca amplificar y obteniendo el uso de ADN degradado o desnaturalizado (Hamer et al., 2019).

Por lo tanto, la presente investigación contribuye a una detección más específica de la bacteria y diagnósticos patológicos referentes a la leptospirosis. La investigación se realizó en el Área de Investigaciones Multidisciplinarias perteneciente al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), Unidad de Diagnóstico Molecular con sede en Guayaquil, con muestras de orina y sangre de caninos, recolocadas dentro del cantón Duran, provincia del Guayas.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Optimizar el protocolo de detección molecular de *Leptospira* spp. en diferentes vectores mediante ensayos moleculares con el propósito de contribuir en el diagnóstico de la enfermedad.

1.3.2. Objetivos específicos

- Comparar los métodos de cuantificación y extracción de ADN según la concentración obtenida mediante fluorimetría.
- Establecer un protocolo de amplificación con diferentes *Master mix* comerciales mediante la técnica qPCR.
- Analizar los resultados obtenidos de los ensayos qPCR mediante parámetros estadísticos.

1.4. Hipótesis

El protocolo optimizado amplifica los controles positivos e internos de la master mix y los genes *Lip32* y *rss 16s* presentes en el ADN extraído de muestras biológicas infectadas por *Leptospiras* patógenas mediante la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa – Tiempo Real (qPCR).

Capítulo 2

Marco teórico

2.1. Género *Leptospira* spp.

Las Leptospiras son bacterias pertenecientes al género *Leptospira* son espiroquetas Gram negativas, aerobias, de crecimiento lento, delgadas, flexibles y enrolladas (Urbanskas et al., 2022). Según los registros históricos, las bacterias cuyo género era *Leptospira* se clasificaba en dos, *Leptospira interrogans* y *L. biflexa*, que comprendían cepas de característica patógenas y no patógenas; no obstante, los primeros estudios moleculares demostraron la existencia de una importante heterogeneidad genética dentro del género, incluyendo análisis más exhaustivos que han permitido describir 15 especies y cinco grupos de hibridación de ADN sin describir en su totalidad (Smythe et al., 2013).

Estas bacterias son aerobias, no resisten la sequía ni la hipertonicidad, sin embargo, soportan la alcalinización a pH 7,8; y al ser las Leptospiras aerobias obligadas, se multiplican en condiciones ideales con temperatura desde los 28°C hasta los 30°C, en medios básicos fortificados con vitaminas B12 y B1, compuestos de amonio y ácidos grasos de longitud extendida, tomando en cuenta que los ácidos grasos prolongados son empleados como depósito único para captación de carbono y son procesados a través de la β -oxidación. (Smythe et al., 2013).

Las Leptospiras son un género de bacterias espirales Gram negativas que se encuentran en todo el mundo y son transmitidas por animales que están infectados, como perros, ratas, cerdos, vacas y caballos; además, tienen la capacidad de acceder al organismo humano por zonas rotas de epidermis o las superficies mucosas, como la nariz, la boca y los ojos (Picardeau, 2020). Son patógenos zoonóticos, esto implica que pueden transferirse desde los animales hacia los seres humanos, cuya afectación pueden causar una enfermedad llamada leptospirosis, la cual tiene la capacidad de ser catalogada desde grave y, en algunos casos, hasta mortal; debido a que una vez que las Leptospiras ingresan al cuerpo, se propagan a través del sistema circulatorio y pueden afectar a varios órganos, incluidos los pulmones, el hígado, el cerebro y los riñones (Rajapakse, 2022).

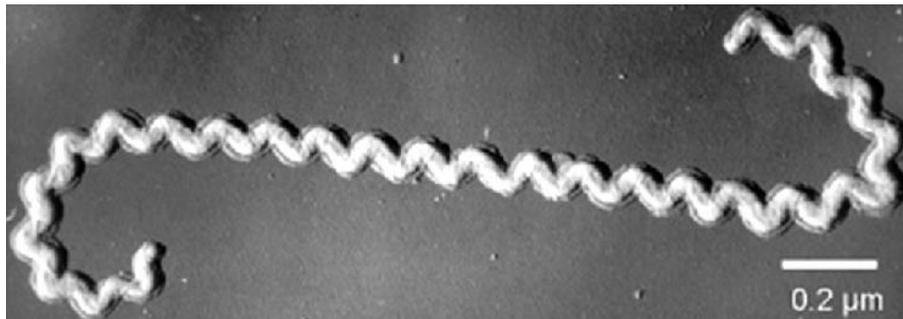


Figura 1. *Leptospira* spp. observada con microscopía electrónica

Fuente: (Pacheco, 2015)

2.1.1. Morfología

Las Leptospiras son bacterias en forma de sacacorchos, que se diferencian de otras espiroquetas por la presencia de ganchos terminales, formadas por una membrana externa con varias proteínas funcionales, catalogadas como bacterias móviles debido a que sus cuerpos tienen un diámetro pequeño que requiere de técnicas como observación microscópica utilizando iluminación de campo oscuro o contraste de fase, las cuales permiten su observación (Haraji et al., 2011). Las características morfológicas de las Leptospiras se detallan en la siguiente Tabla 1:

Tabla 1.

Características morfológicas de la *Leptospira* spp.

Característica	<i>Leptospira</i> spp.	Referencia
Forma celular	Espiral	
Longitud celular	Entre 6 a 20 μm	
Ancho celular	0.1 μm	
Número de espirales	2 a 10	
Flagelos	En cada extremo	Arent et al., (2022)
Tinción Gram	Gramnegativa	
Movilidad	Móviles en su mayoría debido a los flagelos	
Espesor de la pared	Delgada	
Envoltura celular	Carece envoltura celular rígida	

Elaborado por: Los autores, 2023.

2.1.2. Taxonomía y clasificación

Según Urbanskas et al., (2022), la taxonomía de *Leptospira* es bastante compleja debido a la gran diversidad serológica, cuya información detallada se encuentra en la Tabla 2. Especies por separado de *Leptospira* pueden dividirse en grupos serológicos, que a su vez se dividen en serovares (Smythe et al., 2013). Desde un inicio, las *Leptospiras* se clasificaban en dos especies, por un lado la *Leptospira biflexa* con la *Leptospira interrogans*, que distinguían con claridad entre cepas patógenas y saprofitas (no patógenas), pues estas especies se diferenciaron por sus necesidades nutricionales y otras características fenotípicas y, además, se subdividieron en serovares específicos basados en la presencia de antígenos homólogos, definidos por la heterogeneidad estructural de su componente carbohidrato lipopolisacárido (FTA) (60 *L. biflexa* serovares y al menos 225 *L. interrogans* serovares) (Urbanskas et al., 2022).

Tabla 2.

Taxonomía de *Leptospira* spp.

Reino	Bacteria	Referencia
Filo	<i>Spirochaetes</i>	
Clase	<i>Spirochaetia</i>	
Orden	<i>Spirochaetales</i>	Urbanskas et al., (2022)
Familia	<i>Leptospiraceae</i>	
Género	<i>Leptospira</i>	
Especie	<i>L. interrogans</i> y <i>L. biflexa</i>	

Elaborado por: Los autores, 2023.

Clasificación género *Leptospira* spp.

La clasificación de *Leptospira*, detallada en la Tabla 3, se basa en la expresión de los epítomos expuestos a la superficie en un mosaico de los antígenos del lipopolisacárido (LPS), mientras que la especificidad de los epítomos depende de su composición en azúcares y de su orientación (Haraji et al., 2011).

Tabla 3.

Clasificación taxonómica de *Leptospira* spp.

Cepas referentes para algunas especies de la bacteria <i>Leptospira</i>				
Especie	Serogrupo	Serovar	Característica	Referencias
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni		
<i>L. alexanderi</i>	Manhao	Manhao		
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa		
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama		
<i>L. Kmetyi</i>	ND	ND	Patógenas	
<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni		
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe		
<i>L. alstonii</i>	ND	Sichuan		
<i>L. santarosai</i>	Tarassovi	Atlantae		
<i>L. broomii</i>	ND	ND		
<i>L. fainei</i>	Hurstbridge	Hurstbridge		
<i>L. licerasiae</i>	ND	Varillal	Intermedias	
<i>L. inadai</i>	Tarassovi	Kaup		
<i>L. wolffii</i>	ND	ND		
<i>L. yanagawae</i>	Semarang	Saopaulo		
<i>L. meyeri</i>	Semarang	Semarang		
<i>L. vanthielii</i>	Holland	Holland		
<i>L. biflexa</i>	Semarang	Patoc	Saprófitas	
<i>L. terpstrae</i>	ND	ND		
<i>L. wolbachii</i>	Codice	Codice		

Levett,
(2015);
Organización
Panamericana
de la Salud,
(2023)

ND: No definida

Elaborado por: Los autores, 2023.

Clasificación genética

Numerosos estudios han dado a relucir la necesidad de una clasificación genética, debido a que no existe una relación estrecha entre la serotipificación y la clasificación molecular (Ferreira et al., 2014). Según la Tabla 4 descrita a continuación, el serotipo es determinado según los genes y por ende transferidos entre especies:

Tabla 4.

Serovares definidos en diferentes especies *Leptospiras*, según

Serovar	Especie	Referencia
Grippotyphosa	<i>L. interrogans, L. kirschneri</i>	
Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans, L. inadai</i>	
Hardjo	<i>L. borgpetersenii, L. interrogans, L. meyeri</i>	(Ferreira et al., 2014)
Pyrogenes	<i>L. interrogans, L. santarosai</i>	
Pomona	<i>L. interrogans, L. noguchi</i>	
Bataviae	<i>L. interrogans, L. santarosai</i>	
Szwaijizak	<i>L. interrogans, L. santarosai</i>	

Elaborado por: Los autores, 2023.

Desde un comienzo, la taxonomía de las bacterias, no sólo del género *Leptospira*, era en gran medida intuitiva y no estaba definida en su totalidad, por lo que las técnicas de medición de la divergencia evolutiva en la estructura de los ácidos nucleicos introdujeron una importante revolución en la clasificación de las bacterias, por ende, los estudios de hibridación ADN-ADN han dado lugar sin duda a una nueva era genética (Ferreira et al., 2014).

En 1987, un estudio realizado en París, en el Instituto Pasteur determinó que la secuencia completa de ADN sería un patrón válido de referencia para determinar la filogenia y la taxonomía relacionada con la nomenclatura junto a la información genómica de la especie, para que a partir de ahí, la especie sea la única unidad taxonómica que podía definirse en términos filogenético y en general incluiría cepas con un parentesco ADN-ADN con un aproximado del 70% o superior (Arent et al., 2022).

Los estudios de taxonomía molecular, mediante la hibridación ADN-ADN, también han desempeñado un papel fundamental en el entendimiento de la diversidad genética dentro del género *Leptospira*, donde la tipificación genética ha dado lugar a un nuevo esquema de clasificación y se han propuesto siete nuevas genoespecies de *Leptospira*, los diferentes análisis genéticos de siete serovares adicionales, han permitido la inclusión de otra nueva especie *L.*

kirschneri, sumado a una cepa aislada en los últimos años, en un cerdo y dando como resultado la formación de otra especie de *L. fainei* (Arent et al., 2022).

Clasificación serológica

Es posible dividir la bacteria *Leptospira* en grupos por su serología, los cuales también se dividen en serovares, siendo el serovar la unidad sistemática básica en la clasificación serológica, que está representada por una cepa de referencia cuya caracterización serológica tiene importancia diagnóstica y epidemiológica; esta clasificación se realiza en base a anticuerpos anti-*Leptospira* (Ahmed et al., 2012). Los exámenes serológicos más empleados son el ensayo enzimático de adsorción (ELISA) y la prueba de aglutinación microscópica (MAT), siendo esta última, catalogada con una especificidad serovar insuperable y representa el estándar de oro en la detección de leptospirosis, es decir, esta prueba ofrece su mejor rendimiento cuando se lleva a cabo utilizando un conjunto de variantes que representan los tipos de serovariedades presentes de forma local, mientras que se considera a la protección, tanto a través de una infección previa o por medio de vacunación, es exclusiva para cada serovariedad, lo que enfatiza la importancia de tener información sobre estas serovariedades. (Ahmed et al., 2012).

Las serovariedades pueden estar vinculadas a especies que actúan como portadoras crónicas de la enfermedad, es decir, al tener datos sobre las serovariedades, se proporciona una valiosa contribución al diseño de estrategias de control y prevención. (Haraji et al., 2011). Los serovares relacionados se clasifican en serogrupos, que no tienen un estatus taxonómico formal, y hasta la fecha, sin embargo, se han identificado más de 250 serovares patógenos clasificados en 64 serogrupos del género *Leptospira*; por mencionar alguno de ellos: los serovares *Grippityphosa*, *Wolffi*, *Icterohaemorrhagiae*, *Tarassovi*, *Canicola*, *Bataviae*, *Djasiman*, *Hardjo*, *Patoc*, *Copenhageni*, y *Panama*, los cuales están implicados con frecuencia en casos de infección humana (Browne et al., 2022). La clasificación serológica de *Leptospira* en varios cientos de serovares sigue siendo muy valiosa, pero funciona independiente de la clasificación molecular (Ahmed et al., 2012).

2.2. La Leptospirosis

Al ser una enfermedad de etiología bacteriana, de característica infecciosa, surge a raíz del contacto con la *Leptospira*, microorganismo patógeno que puede afectar tanto a seres humanos como animales (Yescas-Benítez et al., 2020). Una vez que este patógeno penetra en el organismo, se expande con velocidad, con el potencial de desencadenar complicaciones de naturaleza severa (Cedano et al., 2019). Su endemia prevalece en diversas zonas tropicales y subtropicales del planeta, en especial, en lugares con infraestructuras sanitarias precarias, tomando en cuenta que la clave para mitigar sus riesgos radica en un tratamiento precoz mediante la administración de antibióticos, lo cual puede atenuar el desarrollo de afecciones más graves, por lo que la leptospirosis representa una amenaza significativa en diversas localidades del mundo (Yescas-Benítez et al., 2020).

2.2.1. Afecciones a la salud poblacional

La leptospirosis es considerada de gran importancia, debido a que es un afección que ha resurgido en los campos de la salud pública y la medicina veterinaria, la cual afecta a humanos y animales, propagándose de manera rápida y causando grandes pérdidas en la producción animal con una particular afectación del bienestar en la vida de los individuos (Bautista et al., 2019). La carencia de conocimiento acerca de esta enfermedad transmitida de animales a humanos en la población conlleva que a menudo no se diagnostique de forma precisa y los pacientes no reciban la atención necesaria, llegando incluso a perder la vida, por lo que resulta primordial ampliar la percepción sobre esta enfermedad, buscando tomar medidas preventivas e regulación en el contexto de la salud colectiva y la medicina veterinaria (Romero-Vivas & Falconar, 2016). Instaurar programas que capaciten de forma adecuada a la población, logrando prevenir y erradicar, en la medida de lo posible, la leptospirosis, lo cual es esencial para proteger tanto a la población como a los animales, permitiendo concientizar sobre los riesgos y la importancia de actuar con prontitud resulta vital, con el propósito de mantener el bienestar y la salud de la sociedad (Bautista et al., 2019).

2.2.2. Epidemiología

- **Distribución e incidencia global**

Esta enfermedad muestra una distribución global, tiende a manifestarse con mayor frecuencia en áreas de clima tropical y subtropical, caracterizadas por temperaturas cálidas y alta humedad, lo cual promueve la supervivencia de la bacteria *Leptospira* y su propagación en el entorno (Allan et al., 2015). Según las estimaciones actuales de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la prevalencia anual de leptospirosis alrededor del mundo supera la cifra de 500,000 casos, considerando que esta patología, conocida por su capacidad epidémica, exhibe un particular aumento en su incidencia luego de eventos climatológicos extremos, tales como intensas precipitaciones o inundaciones (Suárez Conejero et al., 2015).

En el presente año las tasas de seropositividad para la leptospirosis en diferentes continentes fueron las siguientes: En América del Sur, la tasa fue del 36.40%, mientras que América del Norte registró una tasa más baja del 34.05%; pasando a África, la tasa de seropositividad fue del 22.18%, y en Oceanía, se observó que fue del 17.40%; Europa mostró una tasa más baja de seropositividad del 13.30%, mientras que Asia tuvo una tasa más alta del 13.36%, indicando así que estos hallazgos establecen variaciones en la exposición y prevalencia de la leptospirosis en diferentes regiones geográficas (Gomes de Araújo et al., 2023).

Los índices de brotes más altos se han registrado en periodos climatológicos de lluvias por encima del promedio anual de precipitaciones, como es el caso de Europa, en el 2018 donde se registró un alza de casos confirmados de leptospirosis (Jiménez, 2022). La Unión Europea reportó una evolución en la incidencia de casos, registrados desde el año 2001 hasta el 2021; con picos entre 2017 y 2019 relacionado a las inundaciones que sufridas en dicho periodo (Sohm et al., 2023). El European Centre for Disease Prevention and Control, (2022), durante el año 2020, por cada 100.000 habitantes fueron reportados 0,14 casos confirmados, de los cuales 907 casos de leptospirosis se presentaron en 21 países pertenecientes a países de Europa, considerando también al Área Económica Europea, siendo el 62% (565 casos) catalogados como confirmados; no obstante los 342 casos restantes (38%) se clasificaron como probables, y la gran mayoría de estos

casos probables (94%) provinieron de Francia, Alemania, los Países Bajos y Portugal, concentrando el 66% de todos los casos notificados, a pesar de representar solo alrededor del 34% correspondiente al total poblacional que posee la Unión Europea (Jiménez, 2022).

En Asia, a nivel de país, se pudo observar que tanto Tailandia como Laos exhibieron la tasa de incidencia más elevada en relación a la esperada para el sudeste asiático, cifrada en 2.34 casos por cada 100,000 habitantes; sin embargo, a pesar de esta relevante estadística, es necesario enfatizar que debido a su amplia población, Tailandia y Vietnam destacaron como países que poseen un alto registro de casos positivos, representando cada uno, en términos proporcionales, alrededor del 43% y 34% de los casos esperados en toda la región del sudeste asiático (Douchet et al., 2022). Países asiáticos, como Malasia, Tailandia, Filipinas y Sri Lanka, también han registrado índices significativos y semejantes al de países que conforman al continente asiático (Allan et al., 2015).

En América, la incidencia reportada por contagios de leptospirosis se distribuye en la región del Caribe y Sudamérica que muestra una distribución variada (Urbanskas et al., 2022). En Canadá y Estados Unidos, la enfermedad está ausente y no se notifica, excepto por casos relacionados con actividades recreativas en agua dulce (Di Azevedo et al., 2023). México ha experimentado un leve aumento en los casos, en especial, en Veracruz (Yescas-Benítez et al., 2020). En Costa Rica, la incidencia es más alta en ciertas regiones, pero baja en áreas con alta densidad poblacional; asimismo en el Caribe, la leptospirosis es endémica, y Barbados tiene una incidencia elevada, mientras que Jamaica también presenta alta endemidad, pero carece de una prevalencia alta (Browne et al., 2022). En varios países de Sudamérica, la leptospirosis está presente, entre ellos, Uruguay mostrando alta endemidad en ciertas provincias y Brasil con variaciones en la incidencia según sus regiones (Bautista et al., 2019). Argentina, Venezuela y Ecuador también reportan casos de leptospirosis, indicando una situación general que muestra diferentes niveles de endemidad y casos notificados en distintos países de la región (Di Azevedo et al., 2023).

Es esencial tener en cuenta que la distribución de la leptospirosis es dinámica, susceptible de ser afectada por factores climáticos, sociales y económicos, tomando en consideración que, la

detección inadecuada puede incidir en la percepción precisa de su distribución en algunas zonas; por lo tanto, la vigilancia epidemiológica y el seguimiento adecuado se especifican como instrumentos esenciales para obtener una comprensión certera de la dispersión geográfica de la leptospirosis a escala mundial (Browne et al., 2022).

- **Situación en el Ecuador**

Ecuador, según su geografía, situado en el sector noroccidental de América del Sur, ostenta el estatus de endemia en lo concerniente a la leptospirosis, una condición que ha sido reconocida y corroborada tanto a nivel nacional como a escala internacional, donde se han documentado episodios de brotes de esta enfermedad en diversas poblaciones, incluyendo aquellas de carácter urbano, suburbano y rural. (Calvopiña et al., 2023).

Según la Organización Panamericana de la Salud, (2023), Ecuador posee la cuarta prevalencia de la enfermedad, más alta después de Brasil, Perú y Colombia, ocupando el puesto 18 con una incidencia anual de leptospirosis de 11,6 por millón de personas, sumado a la estimación de incidencia anual de un caso por cada 100.000 personas a nivel nacional, con 547 casos notificados entre 2016 y 2020, en especial en las provincias costeras. A pesar de la endemidad de la leptospirosis en el Ecuador, no existe un documento oficial que considere una relación entre la ubicación geográfica de la nación con la enfermedad y las especies de *Leptospira* spp., sin embargo existen publicaciones que registran datos sobre infecciones humanas, afectaciones en animales y al medio ambiente, reportando de un total de 47 publicaciones, de las cuales 22 indican la prevalencia de infecciones en humanos siendo la región donde se registra una mayor incidencia, es especial en las provincias de Guayas y Manabí; 19 reportan afectaciones en animales y el restante en estudios de la prevalencia del agente patógeno bacteriano dentro del entorno ambiental (Calvopiña et al., 2023).

- **Factores de vulnerabilidad**

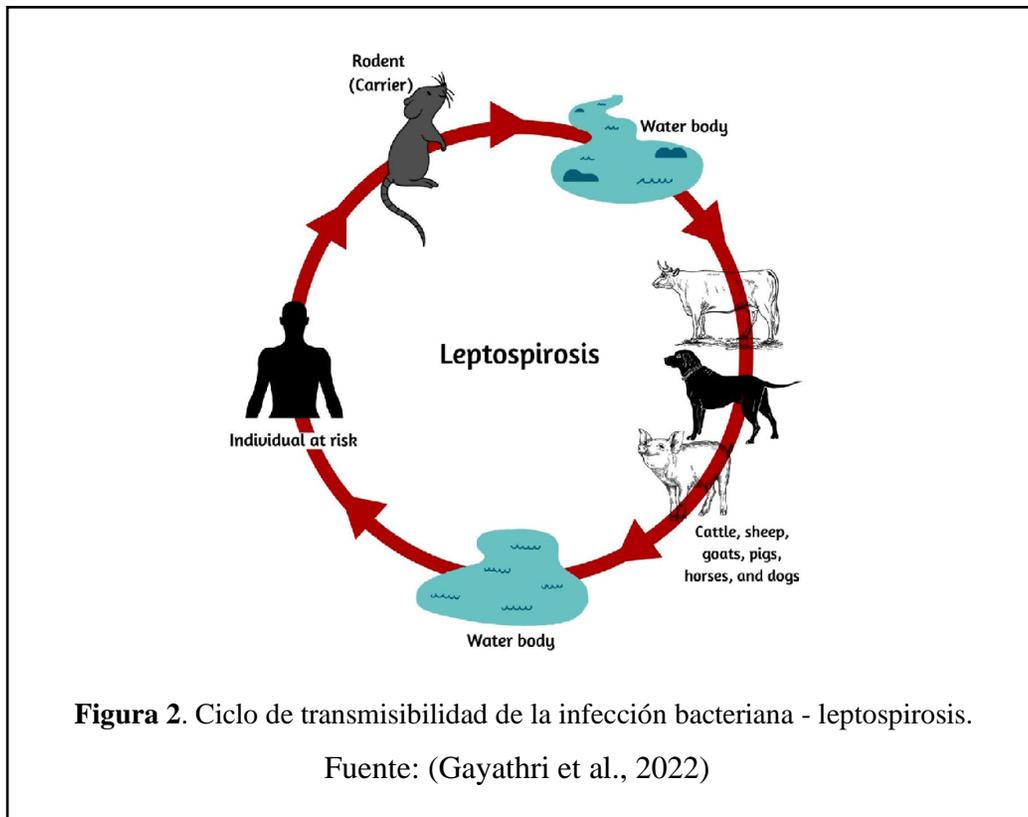
La propagación de esta patología afecta a una extensa variedad, superando el número de 160 variedades de animales, incluyendo tanto aquellos que son salvajes como los domésticos, que funcionan como vectores y fuentes de infección para los seres humanos, entre las especies más perjudicadas, se encuentran en los animales domésticos y roedores silvestres; con especial relevancia en caninos, ganado porcino, bovino, equino y ovino (Morán et al., 2022). Es importante destacar que se la denomina como una afección de peligro en un entorno ocupacional, en particular para individuos de ambos géneros que se encuentran en cercanía directa con animales de compañía, fauna silvestre y sus derivados, así como quienes están involucrados en actividades ganaderas, agrícolas, recolección de desechos o pertenecientes a estratos socioeconómicos bajos (Aranzazu Ceballos et al., 2020).

En áreas tropicales y subtropicales, que registran niveles de lluvia significativos, se promueve la subsistencia de la bacteria en el entorno, lo cual aumenta la posibilidad entrar en contacto con el microorganismo patógeno mediante las inundaciones (Holzapfel et al., 2021). Un porcentaje significativo de personas contrae la infección mientras viaja a naciones tropicales, durante aventuras como el descenso en aguas rápidas, excursiones en la selva o la exploración de cuevas; sin embargo se han registrado casos aislados de transmisión por accidentes de laboratorio, aunque estas instancias son poco comunes (Zamora et al., 2020).

2.2.3. Transmisión

La propagación de las Leptospiras se realiza mediante la excreción secreción urinaria de animales contagiados, entre los que se incluyen cerdos, roedores, gatos, perros, caballos y diversas especies de fauna silvestre, en vista que estas bacterias demuestran una notable capacidad de supervivencia en ambientes acuáticos y terrestres contaminados con orina durante extensos períodos, que pueden extenderse desde semanas hasta meses (Picardeau, 2020). La vía de infección en seres humanos puede darse a través de diversas formas, siendo así en primer lugar, la interacción inmediata con la secreción urinaria o los fluidos reproductivos de animales infectados por agente patógeno o al tener contacto con aguas contaminadas por orina, provenientes de inundaciones, ríos, arroyos y aguas residuales, así como también el suelo húmedo contaminado; en una segunda instancia,

mediante el consumo de alimentos o reservorios acuáticos mezclados con secreciones urinarias o aquellos que contengan rastros de dicha secreción (Romero-Vivas & Falconar, 2016). La transmisión del agente patógeno hacia el organismo humano tiene lugar mediante las membranas mucosas, la membrana conjuntiva ocular y, además, a través de cortes o raspaduras que puedan haber afecto la piel (Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), 2018).



Si bien la propagación de persona a persona es un evento excepcional, se han consignado casos de propagación mediante prácticas sexuales y la alimentación infantil con leche materna, e incluso en raras ocasiones, la infección ha sido adquirida mediante mordeduras de animales (Rajapakse, 2022). En cuanto a las actividades con alto riesgo de contagio, estas comprenden aquellas que involucran una interacción inmediata con animales que son portadores del agente infeccioso, junto a aquellas que puedan conducir a abrasiones en la piel y, por consiguiente, a la exposición al agua o al suelo contaminado (Romero-Vivas & Falconar, 2016). Entre las situaciones de mayor peligro se encuentran la inmersión prolongada en agua contaminada, la sumersión de la cabeza en dicho líquido junto con la ingestión de agua que pueda estar afectada por la presencia de orina animal,

actividades como la eliminación de maleza, el excursionismo y la jardinería también pueden incrementar la probabilidad de contraer la infección. (Castillo & Hidalgo, 2022).

2.2.4. Aspectos clínicos

A través de la infección renal crónica en animales portadores, la *Leptospira* demuestra su habilidad para perdurar en el entorno natural, por esta razón, dichos animales cumplen un papel de vectores que pueden excretar Leptospiras en su orina a lo largo de un extenso período, que podría abarcar varios años, por lo tanto, esta excreción continua y sostenida se convierte en un mecanismo, mediante el cual la bacteria puede encontrar su camino hacia los seres humanos, causando la infección conocida como leptospirosis (Bautista et al., 2019). Sin embargo, el diagnóstico temprano de la infección puede resultar complicado debido a que los síntomas iniciales que presenta guardan relación con la influenza común, en cuyo periodo de incubación exhibe variabilidad en su extensión, oscilando entre 2 y 20 días, en términos generales, con una tendencia a establecerse en un intervalo de 7 a 13 días, considerando también fiebre alta, dolores tanto musculares como articulares, dolores de cabeza intensos y malestar general, los cuales son signos que pueden asociarse tanto a la leptospirosis como a otros cuadros gripales (Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), 2018).

- **Síntomas**

La fase septicémica surge de forma repentina, manifestándose con cefaleas súbitas, dolores musculares de gran intensidad, escalofríos que recorren el cuerpo, fiebre elevada, tos, faringitis, sensaciones dolorosas en el tórax. Y en ciertos individuos, episodios de hemoptisis, continuando con un exudado conjuntival que emerge en el tercer o cuarto día; extendiéndose por un lapso de 4 a 9 días, caracterizada por la repetición de episodios febriles y escalofríos que con frecuencia elevan la temperatura corporal por encima de los 39 °C, para en lo posterior, experimentar una disminución en la temperatura corporal (Aranzazu Ceballos et al., 2020).

La segunda etapa, identificada como la fase de inmunidad, se manifiesta entre el sexto y duodécimo día de la afección, coincidiendo con la identificación de anticuerpos en la sangre, donde los síntomas febriles iniciales yacen en declive, pudiendo surgir una condición de meningitis (Zamora et al., 2020). Aunque en casos raros, se presentan iridociclitis, neuritis del nervio óptico con neuropatías periféricas, y en situaciones severas, se manifiestan afectaciones pulmonares notables con hemorragias en los pulmones, cuya duración total de este periodo suele extenderse de 4 a 30 días (De Brito et al., 2018).

Una variante más grave de la leptospirosis, llamada síndrome de Weil, debido a la presencia de ictericia y, en general, azoemia, anemia, trastornos en el estado de conciencia con fiebre continua, cuya aparición guarda similitud con los casos menos severos; no obstante, evolucionan luego síntomas hemorrágicos atribuibles al daño en los capilares, que abarcan desde epistaxis, hemoptisis, petequias y equimosis hasta, en ocasiones infrecuentes, hemorragias subaracnoideas, suprarrenales o gastrointestinales (Torres et al., 2020). En algunos casos, la trombocitopenia puede hacerse presente, manifestándose entre el tercer y sexto día, en los cuales surgen indicios de fallo en las funciones hepáticas y renales, debido a la presencia de proteínas, leucocitos y glóbulos rojos en la orina, junto a la azoemia; no obstante, el daño hepático es limitado tomando en cuenta que la recuperación puede llegar a ser completa (Zamora et al., 2020).

- **Análisis clínico**

Aquellas personas con la posibilidad de una infección bacteriana, como la leptospirosis deben someterse a una evaluación que involucra la realización de cultivos sanguíneos para detectar la presencia de la bacteria, mediciones de la cantidad de anticuerpos presentes en la fase aguda de la afección, considerando a su vez que, durante la etapa de recuperación (que abarca un periodo de 3 a 4 semanas), deben realizarse un análisis exhaustivo de las células sanguíneas junto a una evaluación completa de los componentes químicos presentes en la sangre finalizando con una determinación de la funciones del hígado y su correcto funcionamiento (Koizumi, 2020).

2.3. Diagnóstico microbiológico

El diagnóstico microbiológico es un procedimiento de detección que posibilita identificar la existencia de microorganismos responsables de infecciones que fundamenta en el análisis de los signos clínicos y en la evidencia del agente generador o de su marca en el cuerpo, cuyo fin es esencial al realizar una adecuada toma y tratamiento de las muestras destinadas al cultivo, las cuales pueden ser examinadas con diagnóstico directos e indirectos (Murray et al., 2021).

- **Directos**

Se refieren a técnicas y métodos, mencionados en la Tabla 5, que permiten identificar microorganismos patógenos o causantes de enfermedades de forma directa a partir de muestras clínicas o ambientales, sin necesidad de un cultivo previo, los cuales son considerados como métodos son rápidos y pueden proporcionar resultados casi inmediatos, lo que es útil en situaciones donde se requiere una acción rápida para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Murray et al., 2021).

Tabla 5.

Tipos de diagnósticos directos con su respectiva descripción y ejemplos

Diagnósticos directos	Descripción	Ejemplos	Referencias
Microscopia	Observación directa de microorganismos en muestras clínicas utilizando microscopios.	Tinción Gram, tinción de Ziehl-Neelsen y tinción de Giemsa	(Martínez & Zavala, 2023)
Pruebas de antígenos	Detección de proteínas específicas en la superficie de microorganismos en muestras clínicas.	Prueba de detección rápida de la gripe (influenza) y Pruebas de detección rápida de COVID-19	(Kinel, 2021)
Microscopía de fluorescencia	Utilización de etiquetas fluorescentes para detectar microorganismos o componentes específicos.	Observación de bacterias marcadas con fluorocromos y Detección de microorganismos en muestras ambientales	(Martínez & Zavala, 2023)
Microscopía electrónica	Uso de haces de electrones para obtener imágenes de alta resolución de microorganismos.	Imágenes de alta resolución de virus y Visualización de estructuras celulares detalladas	(Kinel, 2021)

Elaborado por: Los autores, (2023).

- **Indirectos**

Se refieren a métodos y técnicas, mencionados en la Tabla 6, utilizados para detectar y caracterizar microorganismos causantes de enfermedades o infecciones en el cuerpo humano u otros entornos, a través de la detección de respuestas o efectos indirectos que los microorganismos producen, por ende, estos métodos son contrastados con los diagnósticos microbiológicos directos (Murray et al., 2021).

Tabla 6.

Tipos de diagnósticos indirectos con su respectiva descripción y ejemplos

Diagnóstico indirecto	Descripción	Ejemplos	Referencias
PCR	Amplificación de material genético para detectar secuencias específicas de microorganismos.	Identificación de genes específicos en bacterias patógenas y de material genético viral una muestra de paciente.	(Kinel, 2021)
Serología	Analiza las respuestas inmunológicas del paciente por medio de la identificación de anticuerpos en suero.	Identificación de anticuerpos IgG e IgM contra el VIH y Prueba de anticuerpos en suero de la hepatitis B.	(Murray et al., 2021)
ELISA	Utiliza enzimas para detectar y cuantificar la unión entre antígenos y anticuerpos en muestras.	Detección de antígenos virales en suero e identificación de alérgenos específicos.	(Kinel, 2021)
Hibridación de ácidos nucleicos	Utilización de sondas de ADN o ARN para identificar secuencias genéticas específicas.	Identificación de genes específicos en un microorganismo y detección de virus en una muestra de sangre	(Ahmed et al., 2012)
Espectrometría de masas	Identificación de microorganismos basada en su composición molecular.	Identificación de bacterias mediante perfiles de masas y caracterización de levaduras por sus espectros de masas	(Kinel, 2021)

Elaborado por: Los autores, (2023).

2.3.1. Aislamiento

El aislamiento microbiológico de Leptopiras se puede obtener de muestras de orina, sangre, tejido o de fuentes de agua y se cultivan en medios de cultivo especializados que estimulan la proliferación de la bacteria, el cual requiere condiciones adecuadas de temperatura, humedad y nutrientes para permitir el crecimiento de estas bacterias de crecimiento lento, pero es una técnica esencial para verificar la existencia de la bacteria en las muestras clínicas, ambientales y de animales; tomando en cuenta que, además de proporcionar información valiosa para el diagnóstico y la epidemiología, el aislamiento también contribuye a la comprensión de la diversidad genética de *Leptospira* y su implicación en la salud pública (Grippi et al., 2023).

2.4. Diagnóstico serológico

En la infección bacteriana provocada por las Leptospiras, los anticuerpos se pueden identificar a desde el quinto hasta el décimo día en que comienza a manifestarse la sintomatología de la enfermedad, los anticuerpos pueden ser identificados, tomando una ejemplar durante la semana primera de la afección, porque es esencial realizar la toma de otro ejemplar entre las siguientes dos semanas después para observar cómo aumentan los anticuerpos, con el fin de demostrar el cambio serológico que señala la presencia de una infección causada por Leptospiras, donde se encuentran anticuerpos predominantes como los de clase IgM, seguidos por IgG, los cuales pueden ser detectados mediante distintos métodos, como la fijación de complemento y la hemoaglutinación, utilizando antígenos específicos del género obtenidos de diversas maneras (Céspedes & Glenn, 2002). Aunque las pruebas de ELISA son utilizadas en la actualidad, es importante validar los resultados positivos de esta evaluación mediante la prueba de aglutinación microscópica (Jaimes Camargo & Molina Puentes, 2022).

- **Micro aglutinación (MAT)**

El diagnóstico MAT es un método de diagnóstico utilizado para detectar anticuerpos en la sangre del paciente contra las Leptospiras, por lo tanto, en esta técnica se mezcla el suero del paciente con Leptospiras y se observa bajo el microscopio para identificar la aglutinación, que es la

agrupación de las *Leptospiras* debido a la interacción con los anticuerpos del paciente; los anticuerpos, denominados aglutinantes, suelen ser detectables en la sangre después de 5-7 días de la infección inicial y pueden persistir durante muchos años facilitando el diagnóstico incluso mucho tiempo después de la exposición a la enfermedad (Moreno, 2022). Esta técnica es esencial en áreas endémicas de leptospirosis y durante brotes epidémicos, debido a que confirman la infección y guía el tratamiento adecuado (Céspedes & Glenny, 2002).

- **Macro aglutinamiento**

En este procedimiento, se emplea un antígeno que proviene de un serovar de característica patógena, en una suspensión densa de *Leptospiras*, que ha sido sometido a un tratamiento físico para maximizar la exposición de los sitios antigénicos bacterianos y reducir su especificidad respecto al serogrupo, empleado como depurador para la prueba serológica, tanto en personas como en mamíferos, con el propósito de detectar la leptospirosis (Céspedes & Glenny, 2002).

- **Elisa indirecto IgG.**

Este ensayo se emplea como método de cribado para la detección serológica y epidemiológica de la leptospirosis en seres humanos, tomando en cuenta que los anticuerpos IgG se encuentran como antagonistas a la bacteria *Leptospira* siendo detectables en el suero, uniéndose al antígeno de *Leptospira* (total de antígeno) que se ha adherido a la superficie de microcavidades hechas de poliestireno; eliminando el suero no reactivo mediante lavado y agregando un conjugado que consiste en anticuerpos anti-IgG de humanos unidos a un catalizador (peroxidasa), se realiza otro lavado y se añade un sustrato (peróxido de hidrógeno) con cromógeno, lo que provoca que el sustrato sea transformado por la enzima, originando un cambio de color en el cromógeno. Finalmente, la reacción se detiene utilizando una solución química, lo que resulta en que el nivel cromático obtenido esté relacionado con la cantidad de anticuerpos contra *Leptospira* reportados por muestra. (Céspedes & Glenny, 2002).

- **Elisa indirecto IgM.**

Gracias a una gran variedad de técnicas de ELISA desarrolladas, es posible comparar con la prueba MAT y mostrar la concordancia entre estas, la cual es muy alta, puesto que cuando se utiliza una mezcla de antígenos o un solo antígeno para la prueba de ELISA, es posible identificar anticuerpos IgM dirigidos contra diversos serovares asociados a antígenos, por lo que se requiere asegurar la aplicabilidad en diversas regiones con variaciones de temperatura, y confirmar los sueros positivos mediante la prueba de MAT debido a que los reactivos conservan su estabilidad durante períodos prolongados, garantizando resultados confiables en diferentes condiciones ambientales (García, 2009). Se debe recordar que los anticuerpos dirigidos contra *Leptospiras* en el suero se unen al antígeno de *Leptospira* (antígeno total) que está anclado en la superficie de pequeños compartimentos de poliestireno; el suero restante se elimina mediante lavados, y luego se agrega un compuesto llamado anti-humano IgM conjugado, que está unido a una enzima llamada peroxidasa, tras una fase de incubación, los compartimentos se vuelven a lavar y se introduce una mezcla de peróxido de hidrógeno y un cromógeno; obteniendo que la enzima descompone el peróxido de hidrógeno, lo que hace que el cromógeno altere su color y la reacción se detenga al agregar una solución específica, por lo tanto, el grado del color que se desarrolla está relacionado con la concentración de anticuerpos contra *Leptospiras* encontrados en la muestra (Céspedes & Glenny, 2002).

2.5. Diagnóstico a nivel molecular

Abarca distintos métodos de biología a nivel molecular destinadas a mejorar el estado de salud de las personas mediante la identificación y cuantificación ácido ribonucleico (ARN), secuencias genéticas puntuales de ADN o proteínas, cuyo origen se centra en la necesidad de abordar problemas clínicos que demandan de manera urgente un método de identificación, en lo posible con alta especificidad y sensibilidad, disponible y al alcance de la población. La principal técnica para detectar microorganismos patógenos como las *Leptospiras* es la PCR, a partir de su descubrimiento, se han desarrollado alternativas para mejorar el diagnóstico en el área clínica, tales como: PCR Estándar, PCR múltiple, PCR- RFLP, RT-PCR y RPC-TR o también llamada qPCR, esta técnica requiere que el ADN extraído de los organismos contenga una concentración óptima para su detección (Farfán, 2015).

2.5.1. Extracción de ADN de muestras biológicas mediante kit comercial

Según Tarqui-Terrones et al., (2019) la extracción de ADN con kits comerciales es un proceso diseñado para simplificar la obtención de ADN en muestras biológicas; estos kits suelen incluir varios componentes clave tales como:

- Muestra biológica, contiene el ADN que se desea extraer como tejido, sangre, orina o saliva.
- Solución de lisis celular, que contiene un detergente fuerte para romper las membranas celulares y liberar el ADN.
- Proteinasa K, para degradar proteínas que pueden contaminar o interferir con la extracción y purificación del ADN.
- Solución de precipitación, incluye precipitante, como isopropanol o etanol, que permite que el ADN se agrupe y se separe del resto de las biomoléculas.
- Tubos recolectores, columnas giratorias de filtración o resinas para purificar y separar aún más el ADN de impurezas, que incluye gel de sílice.
- Solución de lavado, como etanol o soluciones tampones, utilizado para eliminar las impurezas de las columnas de filtración.
- Fluorímetro, permite cuantificar la concentración extraída de ADN en nanogramos por microlitros (ng/uL).

2.5.2. Reacción en cadena de la polimerasa - Tiempo real (qPCR)

La técnica molecular conocida como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar de forma exponencial una región en particular del ADN mediante el uso de secuencias de ADN que delimitan dicha región, y que partiendo desde una copia exclusiva de la región a amplificar, obtiene múltiples copias, facilitando una identificación de la presencia de la región de diana en una muestra determinada, por lo que esta técnica ha transformado la biología a nivel molecular, proporcionando una herramienta valiosa para identificar y cuantificar secuencias o patrones concretos de ácido nucleico, de manera eficiente y precisa (Farfán, 2015).

Destaca por su capacidad para realizar un seguimiento en tiempo real de la amplificación del ADN mediante la incorporación de bromuro de etidio y luz UV, para observar el progreso de la reacción

y obtener información valiosa sobre la cantidad de producto amplificado; la qPCR se basa en el uso de reporteros fluorescentes, lo que posibilita la determinación y cuantificación precisa de secuencias en particular de material genético durante cada ciclo de la reacción, ofreciendo una mayor sensibilidad y precisión, complementando con su alta sensibilidad, se establece su utilidad para cuantificar el ADN en muestras con concentraciones bajas, convirtiéndose en una herramienta valiosa en la investigación médica y la biología a nivel molecular (Tamay de Dios et al., 2013).

Para realizar el diagnóstico, se requiere un kit comercial de amplificación PCR con los reactivos requeridos: enzima de la polimerasa, dNTPs, Mg²⁺, buffer y sistema reportero de fluorescencia que es denominado *Master mix*, considerando así también, la elección adecuada de los primers y sondas, la cual es crítica para obtener resultados precisos y específicos, evitando la amplificación no deseada de otras secuencias genéticas; y recipientes que permitan realizar varias reacciones de PCR al mismo tiempo en un solo experimento, que son muy útiles cuando se necesita amplificar fragmentos de ADN o realizar análisis genéticos en paralelo, denominados placas de pocillos múltiples o multipocillos, como se muestra en la Figura 3 (Holzapfel et al., 2021).

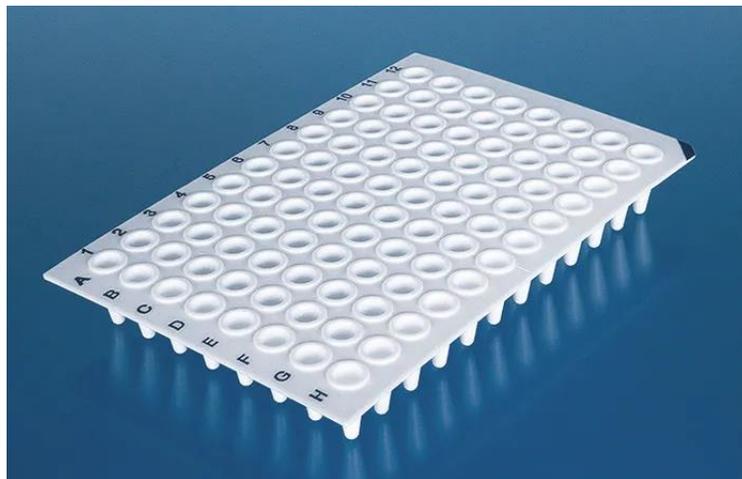


Figura 3. Placa de pocillos múltiples usada para ensayos moleculares

Fuente: (Ferrés, 2015)

La amplificación en una PCR se realiza mediante un termociclador, porque es un dispositivo de laboratorio esencial cuya función principal es controlar de manera precisa las temperaturas en ciclos repetitivos durante la PCR, permitiendo la amplificación selectiva de ADN, con etapas de desnaturalización, anillamiento y extensión, esenciales para replicar fragmentos de ADN, pues automatiza estos ciclos, asegurando resultados consistentes y reproducibles en experimentos de biología molecular (González et al., 2021).

La determinación de la longitud del amplicón, la temperatura de fusión y el rendimiento de amplificación en la qPCR depende de la elección de la especificidad, el contenido de GC (Guanina – Citosina), la longitud, la estabilidad del extremo 3', la complejidad de la secuencia, la temperatura de fusión y la ubicación en la secuencia objetivo de los cebadores (Flores et al., 2020). Los tipos más utilizados según Cheung et al., (2021) son dúplex, tríplex y multiplex, la qPCR dúplex se lleva a cabo con dos reacciones de amplificación en un solo tubo de reacción, a causa de que cada reacción de amplificación está diseñada para detectar y cuantificar una secuencia específica de ADN o ARN, esto permite la evaluación de dos objetivos diferentes en la misma muestra; la qPCR tríplex, trabaja con tres reacciones de amplificación en un solo tubo de reacción obteniendo tres diferentes secuencias, lo que ahorra tiempo y recursos en comparación con la realización de dos qPCRs independientes, por último, la qPCR multiplex permite la amplificación y detección simultánea de múltiples secuencias de ADN o ARN en una sola reacción.

Las amplificaciones obtenidas en las evaluaciones qPCR se analizan mediante el umbral de ciclo (conocido como Ct en inglés), representando el punto crucial en el cual podemos discernir la manifestación de la virulencia del ADN, una vez que este ha alcanzado un nivel detectable, siendo importante destacar que, a medida que el número de ciclos requeridos para alcanzar este umbral disminuye, se reflejan niveles virales más elevados (Al Bayat et al., 2021).

Capítulo 3

Marco metodológico

3.1. Obtención de la muestra

Para el presente proyecto, las muestras fueron elegidas de un conjunto de ejemplares biológicos almacenadas en bajas temperaturas (-80°C) por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), tomadas en 2022 y almacenadas en un congelador a -80°C. Se separaron 20 muestras sanguíneas de caninos, 5 muestras sanguíneas de humanos y 10 muestras de orina de caninos, para la extracción, cuantificación de ADN y ensayos qPCR. En cuanto a la obtención de controles positivos y de control interno para los ensayos qPCR, la institución cuenta con cepas certificadas de *Leptospiras*, provenientes de organizaciones externas, con las cuales INSPI posee convenio y forman parte del proyecto macro del Estudio epidemiológico de Leptospirosis en zonas epidémicas de Durán.

3.2. Extracción y cuantificación de ADN para muestras biológicas

Las muestras biológicas, para la extracción de ADN se separaron por tipo de muestra y rotuladas según el registro de datos de INSPI para el respectivo procesamiento. Los kits comerciales de extracción utilizados para el procesamiento de las muestras biológicas, disponibles en la institución fueron:

- *Invitrogen PureLink® Genomic DNA MiniKit*
- *QIAGEN® DNeasy Blood & Tissue Kit*
- *Wizard® SV Genomic DNA Purification System*

El procesamiento de las muestras fue dividido en seis tratamientos, según se muestra en la

Tabla 7, a continuación:

Tabla 7.

Tratamientos según el tipo de muestra para la extracción de ADN

Trat.	Kit comercial	Tipo de muestra	Hospedero	# Muestras
1	Invitrogen PureLink® Genomic DNA MiniKit	Sangre	Canino	10
2	Invitrogen PureLink® Genomic DNA MiniKit	Sangre	Humano	5
3	Wizard® SV Genomic DNA Purification System	Sangre	Canino	10
4	Wizard® SV Genomic DNA Purification System	Sangre	Humano	5
5	QIAGEN® DNeasy Blood & Tissue Kit	Sangre	Canino	10
6	QIAGEN® DNeasy Blood & Tissue Kit	Orina	Canino	10

Elaborado por: Los autores, 2023.

En los tratamientos 1 y 2, se siguieron las instrucciones y emplearon los reactivos del protocolo pertenecientes al kit *Invitrogen PureLink Genomic® DNA MiniKit*, se separaron 15 tubos Eppendorf estériles de 2mL, 10 tubos para muestras sanguíneas de caninos y 5 para muestras sanguíneas de humano, rotulando cada uno de ellos con el código correspondiente a cada muestra biológica, y se colocaron 200µL en cada tubo rotulado iniciando la lisis celular. En este proceso, se añadieron 20µL de *Proteinasa K* y 20µL de *RNase A* en cada uno de los tubos, se agitaron con vórtex e incubados a temperatura del entorno por 2 minutos, se adicionaron 200µL del *PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer*, se agitaron en vórtex obteniendo mezclas homogéneas, se incubaron en una incubadora de baño seco marca *Labtron LDBI-A10* durante 10 minutos a 55°C y se añadieron 200µL de etanol al 96%, donde la solución final de cada tubo con muestra fue transvasada a nuevos tubos de recolección con columna giratoria, los cuales se centrifugaron a 10000 rpm durante 1 minuto.

Se procedió a los pasos de lavado con cada uno de los buffers contenidos en el kit. Con el *Wash Buffer 1* se colocaron 500µL en cada una de las columnas giratorias, se centrifugaron a 10000 rpm durante un minuto, se descartaron los tubos recolectores y las columnas giratorias fueron colocados en nuevos tubos recolectores. Para el segundo lavado, se añadieron 500µL del *Wash Buffer 2* en

cada columna giratoria, se centrifugaron durante 3 minutos a 21300rpm, se descartaron los tubos recolectores y las columnas giratorias fueron ubicadas en nuevos tubos Eppendorf estériles de 2 mL, los cuales fueron rotulados según el código de la muestra utilizada. Para la elución del ADN, se añadieron 60µL del *PureLink® Genomic Elution Buffer* en cada columna giratoria, se incubaron a temperatura del entorno por 1 minuto, se centrifugaron a 21300rpm durante un 1 minuto, se descartaron las columnas giratorias y los tubos Eppendorf recolectaron el ADN de cada muestra. Posterior a eso, los tubos con las muestras de ADN obtenidas fueron almacenados en el congelador a -80°C.

En los tratamientos 3 y 4, se emplearon las indicaciones y reactivos del protocolo pertenecientes al kit *Wizard® SV Genomic DNA Purification System*, con ligeras modificaciones y se designaron las mismas muestras biológicas utilizadas en los Tratamientos 1 y 2. Se separaron tubos Eppendorf de 2 mL estériles, rotulando cada uno de ellos según el código de las muestras designadas. En estos tubos, se colocaron 900µL del *Cell Lysis Solution* para la fase de lisis celular, se añadieron 300µL de las muestras seleccionadas, se agitaron durante algunos segundos mediante vórtex por 3 ocasiones y se incubaron a temperatura del entorno por 10 minutos. Se centrifugaron cada uno de los tubos a 16000rpm durante 20 segundos, se separó, con mucho cuidado de no perder cantidades de ADN, el sobrenadante de los pellets blancos en cada uno de los tubos, y se repitió este procedimiento por 2 ocasiones. Para aumentar la efectividad de la lisis celular, se añadieron 300µL de *Nuclei Lysis Solution* con 1,5µL *RNase Solution* en cada uno de los tubos y se incubaron en una incubadora de baño seco marca *Labtron LDBI-A10* durante 15 minutos a 37°C.

En reemplazo de la *Protein Precipitation Solution*, se añadieron 100µL de EDTA en cada tubo, se agitaron con vórtex por 20 segundos y se centrifugó a velocidad máxima por 3 minutos, se obtuvieron pellets de color café y sobrenadante en cada uno de los tubos con muestra, se conservaron los pellets en los tubos mientras que el sobrenadante fue removido a nuevos tubos de recolectores, los cuales se rotularon según el código de la muestra contenida. En los nuevos tubos mencionados, se añadieron 300µL de isopropanol, se centrifugaron a máxima velocidad durante 5 minutos, se obtuvieron pellets blancos y sobrenadante, el cual fue removido de cada uno de los

tubos, se añadieron 300µL de etanol al 70%, se agitaron con movimientos invertidos de la muñeca para homogenizar y se centrifugaron a máxima velocidad durante 5 minutos.

Se removió el etanol, con mucho cuidado empleando una pipeta Pasteur, se rehidrató el ADN obtenido con 100µL de agua *UltraPure™ Invitrogen, libre de DNAasa y RNAasa* en cada tubo, se incubaron a baño seco de marca *Labtron LDBI-A10* a 65°C durante 1 hora, por último, se obtuvo el ADN de cada muestra en los tubos rotulados que se almacenaron a -80°C.

En el tratamiento 5 y 6, se utilizaron los reactivos y el protocolo pertenecientes al kit *QIAGEN® DNeasy Blood & Tissue Kit*, se seleccionaron 20 muestras biológicas diferentes a las analizadas en donde, 10 son de sangre y 10 de orina pertenecientes a vectores caninos para la extracción. Se designaron tubos Eppendorf estériles para cada una de las muestras, los cuales fueron rotulados con su respectivo código, separando las muestras de sangre y orina. En cada uno de los tubos Eppendorf, se colocaron 20µL de *Proteinasa K* con 200µL del *Buffer AL*, 100µL de cada muestra, 100µL de PBS, se agitaron en vórtex, se incubaron a 56°C en un equipo *Labtron LDBI-A10* durante 1 minuto, se añadieron 200µL de etanol en cada uno de los tubos, se agitaron en vórtex, para obtener una mezcla homogénea y se trasladó el volumen total acumulado de cada tubo a nuevos tubos recolectores con columna giratoria.

Para los pasos del lavado se utilizaron los buffers AW1 y AW2, incluidos en el kit. Para el primer lavado, se colocaron 500µL del *Buffer AW1* en cada columna giratoria, se centrifugaron a 10000 rpm durante 1 minuto, se descartaron los tubos recolectores y las columnas giratorias fueron colocadas en nuevos tubos recolectores. Para el segundo lavado, se añadieron 500µL del *Buffer AW2* en cada columna giratoria, se centrifugaron a 21300rpm por 3 minutos, se descartó el sobrenadante de cada tubo recolector y las columnas giratorias fueron ubicadas en nuevos tubos Eppendorf de 2 mL, rotulados según el código de la muestra. Para la elución de ADN, se añadieron 60µL del *Elution Buffer*, en cada columna giratoria, se centrifugaron a 10000 rpm durante un minuto, se descartaron las columnas giratorias y se conservaron los tubos Eppendorf con el ADN extraído de cada muestra, las cuales fueron almacenadas a -80°C.

La cuantificación del ADN recuperado de las muestras biológicas fue realizada utilizando un fluorímetro marca *Promega Quantus™ Fluorometer*, el cual incluye reactivos y un protocolo guía, provistos por la institución. Para la cuantificación, se necesitaron tubos estériles Eppendorf de 0,5mL, pipetas automáticas (2,5µL - 200µL), agua *UltraPure™ de Invitrogen, libre de DNAasa y RNAasa*, las muestras de ADN extraídas, y el kit de cuantificación *Promega QuantiFluor® Dye Systems*. El fluorímetro fue calibrado con 1 µL del estándar *QuantiFluor® ONE Lambda DNA* con 200µL de *QuantiFluor® ONE dsDNA Dye*, los cuales fueron ubicados en un tubo Eppendorf de 0,5 mL; y con la lectura de un blanco muestral, colocando en un nuevo tubo Eppendorf, 200µL *QuantiFluor® ONE dsDNA Dye* con 1 µL de agua ultrapura. A final, se cuantificaron cada una de las muestras de ADN por triplicado y cuyos datos fueron registrados por separado según el tratamiento empleado, tal como se indica en el

Anexo 2.

3.2.1. Análisis estadístico

Los resultados de cuantificación del ADN por tratamiento aplicado en cada muestra biológica fueron reportados en ng por µL, donde los valores resultantes fueron analizados con el programa estadístico *InfoStat* versión 2020. Se estimaron los resultados mediante la prueba Shapiro & Wilks para determinar la normalidad con 0,05 del valor de nivel de significancia y aplicar el análisis estadístico correspondiente.

3.3. Extracción y cuantificación de ADN para control positivo: serovares de *Leptospira* spp.

Las muestras de especies patógenas de *Leptospira* spp. que se utilizaron para los respectivos controles, fueron seleccionadas según su serogrupo y especificidad, de acuerdo con la base de datos de INSPI. Se tomaron dos alícuotas de cada una de las siguientes especies:

- *Grippityphosa* (GRI) perteneciente a la especie *L. kirschneri*
- *Icterohaemorrhagiae* (IC) perteneciente a la especie *L. interrogans*

Para obtener el ADN de serovares de Leptospiras, se empleó la técnica del Shock Térmico, en el cual se recolectaron 300 µL de la cepa en tubos Eppendorf estériles de 2 mL, los cuales fueron

centrifugados a 21300 rpm durante 5 minutos, se retiraron los tubos Eppendorf de la centrifuga y se retiró el líquido sobrenadante, asegurando no perturbar el sedimento, se suspendió el sedimento en agua *UltraPure™ de Invitrogen, libre de DNAasa y RNAasa*, las muestras se trasvasaron a nuevos tubos Eppendorf estériles de 0,5 mL, se colocaron en el termociclador marca *Mastercycler Eppendorf Nexus* durante 10 minutos y se cuantificó el ADN, utilizando un fluorímetro marca *Promega Quantus™ Fluorometer* (Bruno et al., 2021). Por último, la cuantificación del ADN recuperado en los ejemplares de serovares de *Leptospira* spp. se realizó de la misma manera como en las muestras biológicas, donde se midió por triplicado cada muestra, se registraron para una estimación más precisa y se almacenaron los tubos con el ADN extraído a -25°C.

3.4. Ensayos qPCR para estandarización de protocolo

3.4.1. Controles internos y controles positivos.

Para estandarizar el protocolo qPCR, se utilizaron los ADN extraídos de las cepas de *Leptospira*, y 3 *Master mix* provistas por la institución, para lo cual se establecieron 5 ensayos, como, a continuación, se detalla en la

Tabla 8:

Tabla 8.

Ensayos para estandarización de protocolo qPCR con controles positivos

Ensayos	Kit	Descripción
E1	EXPRESS® qPCR SuperMix	Final Volume: 15 µL Mix Volume: 10µL Template Volume: 5µL Primers: <i>Lip32; secY; β-actina</i>
E2	Fast Advanced® NO UNG	Final Volume: 15 µL Mix Volume: 10µL Template Volume: 5µL Primers: <i>Lip32; secY; β-actina</i>
E3	GoTaq® MasterMix	Final Volume: 15 µL Mix Volume: 10µL Template Volume: 5µL Primers: <i>Lip32; secY; β-actina</i>
E4	GoTaq® MasterMix	Final Volume: 10 µL Mix Volume: 5µL Template Volume: 2,5µL Primers: <i>Lip32; secY; β-actina</i>

E5

GoTaq® MasterMix

Final Volume: 10 µL

Mix Volume: 5µL

Template Volume: 2,5µL

Primers: *16s*; *secY*; *β-actina*

Elaborado por: Los autores, 2023.

Para todos los ensayos se realizaron PCR Triplex en Tiempo Real, utilizando los siguientes primers y sondas detallados a continuación, según Ferreira et al., (2014):

- Gen *Lip32*: Reportado en el canal A, destinado a la detección de *Leptospira* spp.
- Gen *secY*: Reportado en el canal B, en destinado a amplificar cadenas de *Leptospira interrogans*.
- Gen *16s*: Reportado en el canal A, para la identificación de *Leptospira* spp.
- Gen *β-actina*: Reportado en el canal C, como control interno para monitoreo de la presencia de inhibidores potenciales de la amplificación:

En el ensayo 1 (E1), se seleccionó el *Master mix EXPRESS® qPCR SuperMix*, para el cual se calcularon los volúmenes necesarios de reactivos y muestra de ADN según el número de reacciones necesarias, según su protocolo detallado en la

Tabla 9. Para la preparación de las reacciones, se colocaron los reactivos en una placa de pocillos múltiples, dentro de una cabina de flujo laminar, ubicada en el área blanca del laboratorio y la muestra de ADN de los controles positivos fue colocada en dicha placa en el área de extracción de ADN del laboratorio, en una cabina de flujo laminar diferente. La placa multipocillos fue llevada al termociclador de PCR-Tiempo Real marca *LightCycler® 480 System* de la empresa *Roche Diagnostics*, con su respectivo software de manejo en donde se parametrizaron las fases de la amplificación, número de ciclos, tiempo y temperatura, según el *Master mix* empleado, como se indica en la Tabla 10.

Tabla 9.

Componentes y concentraciones de master mix y muestra de ADN para ensayos qPCR con volumen 20uL

Master mix qPCR - TRIPLEX LIP32/16s		
Componente PCR	Descripción/Concentración	Volumen por reacción (µL)
<i>Master mix</i>	1x	10
Foward LIP32/16s	10mM	0,4
Reverse LIP32/16s	10mM	0,4
Probe LIP32/16s	10mM	0,3
Foward B-Actina	10mM	0,4
Reverse B-Actina	10mM	0,4
Probe B-Actina	10mM	0,3
Foward SecY	10mM	0,4
Reverse SecY	10mM	0,4
Probe SecY	10mM	0,3
H2O UltraPure		1,7
ADN	Template	5
Total		20

Elaborado por: Los autores, 2023.

Tabla 10.

Fases y condiciones de qPCR para los ensayos y pruebas

Fase qPCR	Temperatura (°C)	Duración (hh:mm:ss)	No. Ciclos
Pre-incubación	95	0:05:00	1
Desnaturalización	95	0:00:15	45

Alineamiento / Extensión	60	0:01:00	
Disociación	40	0:05:00	1

Elaborado por: Los autores, 2023.

En el ensayo 2 (E2) y 3 (E3) se replicó el mismo procedimiento del E1, pero modificando la *Master mix* por *TaqMan™ Fast Advanced Master mix NO UNG* y la *Promega GoTaq® Master mix*, se calcularon los volúmenes respectivos destinados a cada uno de los reactivos, primers y muestra de ADN según el número de reacciones necesarias, acorde a su protocolo, como se muestra en la

Tabla 9.

En el ensayo 4 (E4), se utilizó la *Master mix Promega GoTaq® MasterMix*, para el cual se calcularon los volúmenes respectivos destinados a cada uno de los reactivos, y muestra de ADN según el número de reacciones necesarias (Tabla 11). Los primers empleados en este ensayo se mantuvieron acorde a los utilizados en los ensayos previos. Para el ensayo 5 (E5) se utilizó el mismo protocolo modificando el primer del gen *Lip32* por el gen *rss 16s*, cuyos volúmenes para cada reactivo, primer y muestra de ADN se detallan en la Tabla 11. Las placas de pocillos múltiples pertenecientes al E4 y E5 fueron llevadas por separado al termociclador de PCR-Tiempo Real marca *LightCycler® 480 System* de la empresa *Roche Diagnostics*, en donde se parametrizaron las fases de la amplificación, número de ciclos, tiempo y temperatura, según la *Master mix* empleada, como se indica en la Tabla 10.

Tabla 11.

Componentes y concentraciones de master mix y muestra de ADN para ensayos qPCR con volumen de 10uL

Kit GoTaq MasterMix - TRIPLEX LIP32/16s		
Componente PCR	Descripción/Concentración	Volumen por reacción (µL)
GoTaq® MasterMix	1x	5
Foward Lip32/16S	10mM	0,2
Reverse Lip32/16S	10mM	0,2
Probe Lip32/16S	10mM	0,15
Foward B-Actina	10mM	0,2
Reverse B-Actina	10mM	0,2
Probe B-Actina	10mM	0,15
Foward SecY	10mM	0,2
Reverse SecY	10mM	0,2
Probe SecY	10Mm	0,15
H2O UltraPure		0,85
ADN	Template	2,5
Total		10

Elaborado por: Los autores, 2023.

3.4.2. Muestras biológicas

El tratamiento adecuado para realizar el ensayo con muestras biológicas se seleccionó según la cantidad de ADN extraído con los kits comerciales evaluados, teniendo 10 muestras de sangre de caninos organizadas en una placa de pocillo de usos múltiples, como se indica en la Figura 4. Las dos pruebas qPCR Triplex sometidas a estudio fueron:

- Prueba Lip32 (PLip32): primera prueba evaluando el gen *Lip32*.
- Prueba 16s (P16s): segunda prueba evaluando el gen *rss 16s*.

Para cada prueba, se prepararon un número total de 24 reacciones, las cuales incluyeron 3 repeticiones por cada control y muestras biológicas.

Los canales de detección para cada primer fueron establecidos de la siguiente manera:

- a. Canal A: Para el gen *Lip32* y el gen *rss 16s*.
- b. Canal B: Para el gen *secY*.

c. Canal C: Para el gen β -actina.

Para la prueba PLip32, se utilizó la *Master mix Promega GoTaq®*, con el que se realizaron los respectivos cálculos de volúmenes para reactivos y muestras biológicas, siguiendo el mismo procedimiento del E4, según como se indica en la Tabla 11. Para la prueba P16s se utilizó la misma *Master mix*, se modificó el primer del gen *Lip32* por el gen *rss 16s*, se realizaron los cálculos de reactivos y muestras biológicas, como lo indica la Tabla 11. La placa multipocillos fue llevada al termociclador de PCR-Tiempo Real en cada prueba, donde se parametrizaron las fases de la amplificación, número de ciclos, tiempo y temperatura como se indica en la Tabla 10.

Columnas y filas de placa de pocillos múltiples para pruebas PLip32 y P16s

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CN	67S			CN	67S			CN	67S		
B	38S	68S			38S	68S			38S	68S		
C	40S	69S			40S	69S			40S	69S		
D	41S				41S				41S			
E	49S				49S				49S			
F	55S				55S				55S			
G	59S		GRI		59S		GRI		59S		GRI	
H	66S		IC		66S		IC		66S		IC	
5 uL enzima												
Template												
2,5 uL												

Figura 4. Distribución de las muestras biológicas de sangre, divididas en tres secciones para sus réplicas con controles positivos y negativos. CN: Control Negativo; GRI: Control Grippotyphosa; IC: Control Icterohaemorrhagiae; #Muestra "S": Sangre

Elaborado: Los autores, 2023.

3.4.3. Análisis estadístico

Con las pruebas qPCR con muestras biológicas de sangre canina se obtuvieron valores del umbral con número de ciclos (Ct) por cada muestra y fueron registrados, según el canal de detección del termociclador utilizado. Para el análisis de los valores registrados, se tomaron en cuenta los Ct reportados en el canal de detección A, que corresponde tanto al primer del gen *Lip32* de la prueba Lip32 como al primer del gen *rss 16s* de la prueba 16s, puesto que fueron las únicas modificaciones entre pruebas, se evaluaron los estadísticos descriptivos, en el programa *Infostat* versión 2020, para cada prueba y se compararon los porcentajes de muestras amplificadas y no amplificadas con gráficos circulares o de pastel.

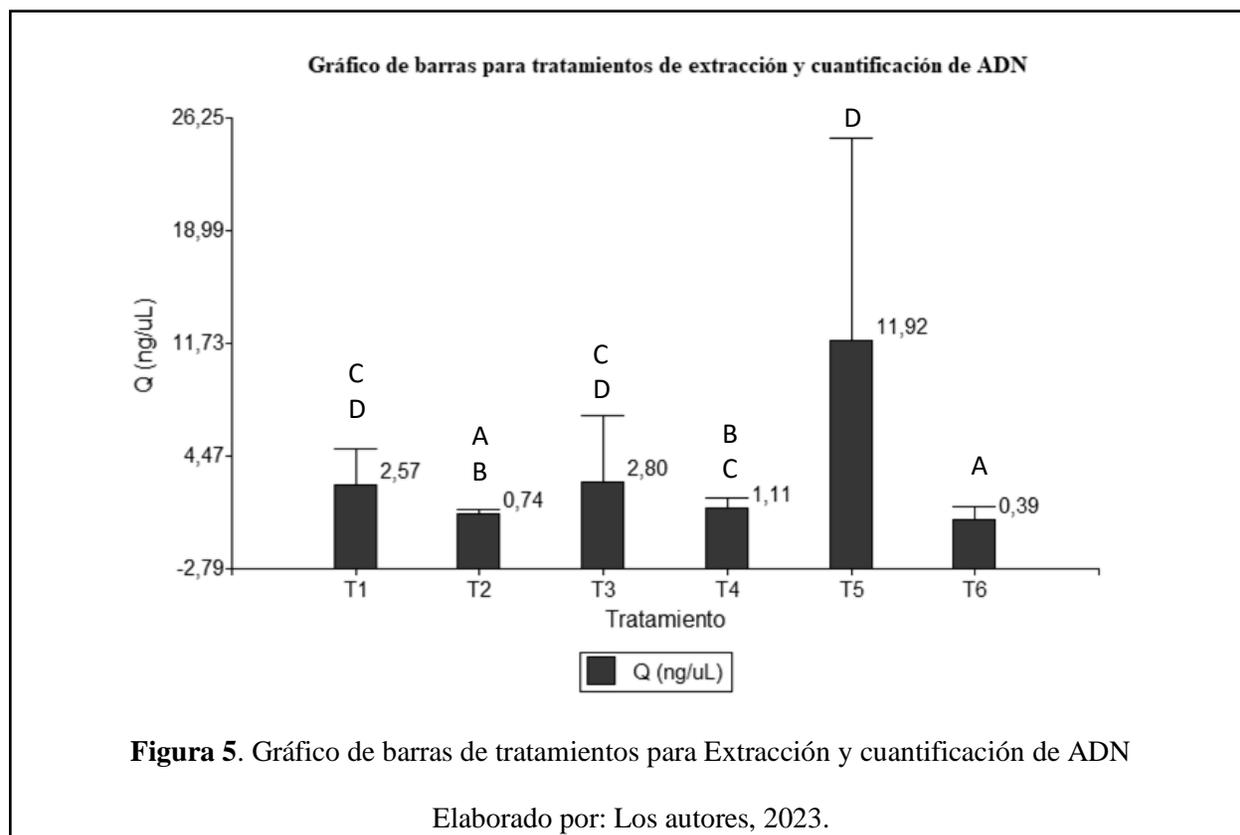
Capítulo 4

Resultados y discusión

4.1. Cuantificación de ADN extraído por kits comerciales

En los resultados para cada tratamiento del T1-T5 de ADN extraído de los ejemplares biológicos, en la prueba de normalidad, se obtuvo un p-valor menor a 0,05 para todos los tratamientos, lo que indica que los datos de la variable “Cuantificación de ADN” no son paramétricos, por lo que se realizó la prueba Kruskal-Wallis en la que se obtuvo un valor p de 0,0001 (Anexo 5) el cual es menor al valor-p de significancia de 0,05 reportando que al menos uno de los tratamientos es diferente y categorizándolos según los caracteres A,B,C y D, como se aprecia en la Figura 5.

El T5 obtuvo una categoría individual, obteniendo una cantidad promedio de 11,92 ng/uL de ADN, lo cual es estadísticamente mayor a comparación de los otros tratamientos, y el T6 fue el tratamiento que obtuvo la menor cantidad de todos los evaluados en el trabajo experimental, con un valor de 0,39 ng/uL.



En un estudio presentado por Luigi et al., (2015) se realizó la extracción de una cepa bacteriana perteneciente a *Salmonella* spp., con el kit *Wizard® SV Genomic DNA Purification System*, utilizado en la presente investigación y obtuvo una concentración media de material genético de 1000ng/uL, es un valor mayor comparado al valor de 11,92 ng/uL, debido a que ellos utilizaron cepas puras cultivadas, lo que indica que el número de microorganismos en la muestra es proporcional al valor de cuantificación de ADN.

4.2. Amplificación de los controles por técnica qPCR

Los resultados de la estandarización del protocolo de qPCR con controles fueron analizados de manera cualitativa mediante variables categóricas binarias. La representación simbólica fue establecida, de forma que el valor “1” representó la amplificación de los controles, mientras que el valor “0” indicó la no amplificación de dichos controles. Se reportan los resultados obtenidos por cada ensayo realizado en la Tabla 12, estableciendo que la *Master mix GoTaq® MasterMix*, empleada en los ensayos 3, 4 y 5 fue seleccionado para las pruebas PLip32 y P16s con muestras

biológicas porque permitió amplificar los controles. De los cinco ensayos realizados, solo uno de ellos, el ensayo 2 (E2), con la *Master mix Fast Advanced® NO UNG*, no amplificó los controles empleados para la prueba, debido a su característica “No UNG”, lo cual se refiere a la ausencia de la uracil-N-glicosilasa, una enzima que se emplea durante la primera fase de la amplificación, la cual elimina uracilos de algún ADN contaminado con un ARN e interviene en el aumento de la especificidad y sensibilidad de la PCR (Doi et al., 2021). La *Master mix* utilizada en el ensayo 1 (E1), si amplificó, pero no fue tomada en cuenta para las pruebas con muestras biológicas debido a la baja disponibilidad de reactivo para su realización.

Tabla 12.
Resultados de ensayos según los kits comerciales designados con variables categóricas binarias

Amplificación controles positivos		
Ensayo	Kit	Resultado
E1	EXPRESS® qPCR SuperMix	1
E2	Fast Advanced® NO UNG	0
E3	GoTaq® MasterMix	1
E4	GoTaq® MasterMix	1
E5	GoTaq® MasterMix	1

Elaborado por: Los autores, 2023.

Para la selección de la *Master mix* destinada a las pruebas PLip32 y P16s se pueden emplear cualquiera de los ensayos que lograron amplificar los controles, considerando que la variación de volumen de *Master mix* no interfiere en la amplificación.

En un estudio mostrado por Flores et al., (2020), se realizó una evaluación con tres PCR en Tiempo Real para detectar *Leptospiras* patógenas, utilizando 18 cepas de referencias, siendo seis de estas especies de característica patógena para los controles positivos, incluyendo las cepas evaluadas en la presente investigación, y los controles negativos del estudio se establecieron con 28 controles con cepas de *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. y *Proteus* spp; esto les permitió obtener un protocolo estandarizado para PCR en Tiempo Real que mantenga el 100% del nivel de especificidad para la identificación de *Leptospiras* de característica patógena en muestras biológicas de animales domesticados.

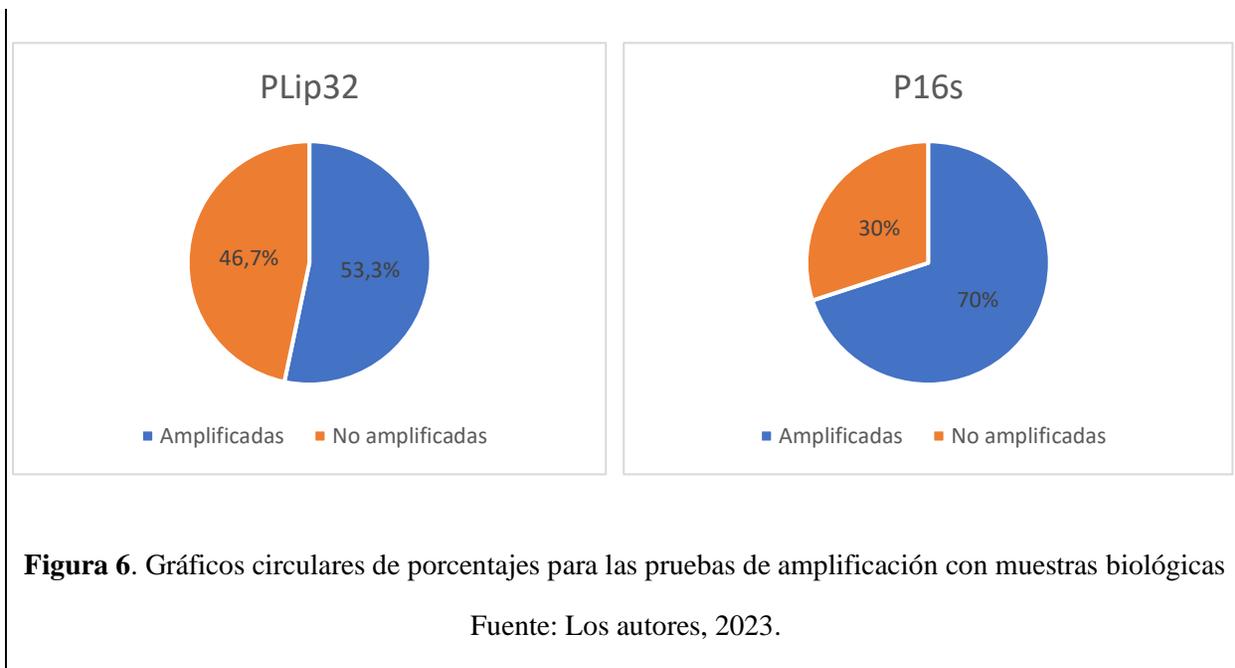
4.3. Pruebas PLip32 y P16s con muestras biológicas de sangre

- **Porcentajes de amplificación**

Mediante gráficos circulares, mostrados en la Figura 6, se comparan los resultados de amplificación de muestras biológicas con porcentajes de aquellas que sí obtuvieron curva de amplificación con los ejemplares que no amplificaron en las pruebas PLip32 y P16s de PCR-Tiempo Real.

Los resultados recopilados en las pruebas PLip32 y P16s con muestras biológicas de sangre canina mostraron el 70 y 53,3% de muestras amplificadas, respectivamente. Esto indican que el protocolo empleado en la prueba P16s con el primer del gen *rss 16s*, estandarizado en el ensayo 5, sí amplificó en la detección molecular de *Leptospiras* patógenas en las muestras analizadas, marcando una diferencia frente a la prueba PLip32 con el primer del gen *Lip32* modificado para la qPCR.

Pruebas de amplificación con muestras biológicas



En el estudio presentado por Podgoršek et al., (2020), se llevó a cabo un análisis mediante qPCR dúplex utilizando los primers Lip32 y 16s, logrando una amplificación de 31 muestras de sangre de 234 totales usando el gen *Lip32* y 16 muestras de sangre del mismo total utilizando el gen *16s*, representando el 13 y 7%, respectivamente. Esto se comparó con la técnica utilizada en nuestro estudio, qPCR Triplex, en la que también obtuvimos porcentajes de amplificaciones similares; por lo tanto, se concluye que ambas técnicas arrojaron resultados óptimos.

- **Parámetros estadísticos**

Los resultados obtenidos de las muestras biológicas se evaluaron según su valor Ct obtenidos por qPCR. Las medias obtenidas para los valores de Ct de las pruebas con muestras biológicas fueron de $32,64 \pm 3,81$ en PLip32, en tanto que en P16s fue de $36,46 \pm 1,25$; la varianza obtenida en PLip32 de 13,54 significa que los datos están más dispersos en comparación con el valor de 1,48 de P16s indicando que son muy consistentes, y que todos los resultados de dicha prueba son similares. La mediana en la prueba PLip32, cuyo valor es de 33,80 tiene una tendencia a producir resultados inferiores a los de la prueba P16s, que tiene una mediana de 36,36. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la mediana no nos proporciona información sobre la variabilidad de los resultados (Ganga-Contreras et al., 2022).

El análisis de los estadísticos descriptivos para los valores de Ct obtenidos en cada prueba son mostrados en la Tabla 13:

Tabla 13.
Estadísticos descriptivos para los resultados de las pruebas PLip32 y P16s con muestras biológicas

Parámetros	Ct – Plip32	Ct – P16s
N	15	21
Media	32,64	36,46
D.E.	3,81	1,25
Var (n)	13,54	1,48
E.E.	0,98	0,27
Mín.	20,65	34,74
Máx.	34,69	40,00
Mediana	33,80	36,36

Elaborado por: Los autores, 2023

De acuerdo con la información expuesta en la Tabla 13, se constata que los valores de Ct correspondientes a la PLip32 exhiben una notable analogía con los datos demostrados en el estudio de Rahman et al., (2023), cuyos resultados se sitúan en un intervalo que fluctúa entre 23,80 y 31,90. Esta similitud de resultados plantea una coherencia intrínseca en los datos y, como consecuencia, sustenta la vigencia de los descubrimientos adquiridos en este contexto de investigación.

4.4. Optimización de protocolo qPCR optimizado

Protocolo estandarizado			
El procedimiento de PCR de ejemplo a continuación muestra volúmenes apropiados para una única reacción de 10 - 15 uL. Para múltiples reacciones, prepare una mezcla maestra de los componentes comunes a todas las reacciones para minimizar errores al pipetear, y luego distribuya los volúmenes apropiados en cada tubo de reacción de qPCR de 0,2-0,5 mL antes de agregar el ADN molde y los primers.			
1	Manejo de muestras	Descongelar, mezclar y centrifugar cuidadosamente cada componente antes de usar.	
2	Extraer y cuantificar ADN	Seguir las indicaciones del protocolo para el kit QIAGEN® DNeasy Blood & Tissue Kit y cuantificar por fluorimetría.	
		Ajustar los volúmenes de reacción según sea necesario para la aplicación. Añadir los siguientes componentes a cada tubo de reacción qPCR.	
	Componente	Reacción 10 uL	Reacción 15 uL
	GoTaq® qPCR Master Mix	5	7,5
			Concentración final
			1x

Figura 8. Protocolo estandarizado para detección de *Leptospiras* patógenas

Fuente: Los autores, 2023.

Capítulo 5

Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

- Se detectó una marcada disparidad en las concentraciones de ADN obtenidas al emplear diversos kits comerciales de extracción y cuantificación. En concreto, el kit *Qiagen DNeasy® Blood & Tissue kit* demostró una superior eficacia en la extracción y cuantificación del ADN en contraste con los demás kits probados. La validación de

concentración de ADN por fluorimetría indica precisión y reproducibilidad como método cuantitativo, debido a que las mediciones repetidas mostraron una consistencia notoria. Estos resultados enfatizan la importancia de elegir el método adecuado para garantizar mediciones precisas y reproducibles de las concentraciones de ADN.

- Durante la evaluación de distintos protocolos de *Master mix* comerciales en la amplificación de ADN mediante qPCR, se destacó que el protocolo GoTaq® *Master mix* exhibió una mayor eficiencia de amplificación, manifestada por una reducción significativa en el valor de Ct en comparación con los demás protocolos analizados. Estos resultados resaltan la importancia crítica de la elección adecuada de la *Master mix* comercial, pues desempeña un papel fundamental en la obtención de resultados qPCR precisos y reproducibles, aspecto vital en la investigación y diagnóstico molecular.
- Los análisis estadísticos aplicados a los tratamientos de extracción de ADN y las pruebas qPCR con muestras biológicas permitieron validar los diferentes procedimientos realizados para seleccionarlos de manera adecuada e incluirlos en el protocolo estandarizado, aportando con resultados favorables para el trabajo experimental y con la ventaja de ser reproducibles en investigaciones posteriores.
- La estandarización del protocolo optimizado para la identificación de *Leptospiras* con característica patógena aporta significativa a INSPI, puesto que contribuye con el estudio de la enfermedad a nivel nacional mediante el diseño de estrategias de control y prevención de la enfermedad. Quedan abiertas las posibilidades de enfatizar más con el estudio de la *Leptospira* spp., y profundizar sus afectaciones para la salud pública y medio ambiente.

5.2. Recomendaciones

- Trabajar en mejorar el modelo utilizado en esta tesis para determinar la sensibilidad y especificidad de la qPCR en la detección de *Leptospira*, incorporando datos clínicos y de campo, como también variando la concentración de los componentes del protocolo. Esto podría incluir la recopilación de muestras de pacientes y muestras ambientales para validar la eficacia del protocolo incluso antes de infectar especies hospederas o transmisoras de la enfermedad.

- Explorar la aplicación de técnicas avanzadas de amplificación de señales, como la amplificación de señales químicas o la amplificación isoterma, para mejorar la detección de *Leptospira* en muestras de bajo nivel de concentración.
- Investigar la posibilidad de desarrollar un protocolo multiplex que permita detectar múltiples serovariedades de *Leptospira* en una sola reacción qPCR, lo que sería de gran utilidad en la epidemiología y diagnóstico de la leptospirosis.

Bibliografía

- Ahmed, A., Grobusch, M. P., Klatser, P. R., & Hartskeerl, R. A. (2012). Molecular approaches in the detection and characterization of *Leptospira*. *J Bacteriol Parasitol*, 3(2), Article 2.
- Al Bayat, S., Mundodan, J., Hasnain, S., Sallam, M., Khogali, H., Ali, D., Alateeg, S., Osama, M., Elberdiny, A., & Al-Romaihi, H. (2021). Can the cycle threshold (Ct) value of RT-

- PCR test for SARS CoV2 predict infectivity among close contacts? *Journal of infection and public health*, 14(9), 1201-1205.
- Allan, K. J., Biggs, H. M., Halliday, J. E. B., Kazwala, R. R., Maro, V. P., Cleaveland, S., & Crump, J. A. (2015). Epidemiology of Leptospirosis in Africa: A Systematic Review of a Neglected Zoonosis and a Paradigm for 'One Health' in Africa. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(9), e0003899. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003899>
- Aranzazu Ceballos, A. D., Apraez Henao, L., Ortiz Marín, D. C., Aranzazu Ceballos, A. D., Apraez Henao, L., & Ortiz Marín, D. C. (2020). Leptospirosis in pediatrics, a diagnosis to be considered. *Revista chilena de infectología*, 37(6), 728-738. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182020000600728>
- Arent, Z., Pardyak, L., Dubniewicz, K., Płachno, B., & Kotula-Balak, M. (2022). *Leptospira* taxonomy: Then and now. *Medycyna Weterynaryjna*, 78(09), Article 09. <https://doi.org/10.21521/mw.6694>
- Bautista, B. R. B., Castañeda, D. M. B., López, H. A., Díaz, A. M., & Pulido, M. O. (2019). Leptospirosis: Enfermedad de gran importancia en salud pública. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 11(2), Article 2. <https://doi.org/10.24188/recia.v11.n2.2019.727>
- Browne, E. S., Callefe, J. L. R., Jesus, E. R. S. D., Zeppelini, C. G., Cremonese, C., & Costa, F. (2022). A Systematic Review of the geographic distribution of pathogenic *Leptospira* serovars in the Americas, 1930-2017. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 94, e20201026. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202220201026>
- Bruno, A., Mora, D. de, Freire-Paspuel, B., Rodriguez, A. S., Paredes-Espinosa, M. B., Olmedo, M., Sanchez, M., Romero, J., Paez, M., Gonzalez, M., Orlando, A., & Garcia-Bereguiain, M. A. (2021). Analytical and clinical evaluation of a heat shock SARS-CoV-2 detection

- method without RNA extraction for N and E genes RT-qPCR. *International Journal of Infectious Diseases*, 109, 315-320. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.06.038>
- Calvopiña, M., Romero-Alvarez, D., Vasconez, E., Valverde-Muñoz, G., Trueba, G., Garcia-Bereguiain, M. A., & Orlando, S. A. (2023). Leptospirosis in Ecuador: Current Status and Future Prospects. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8040202>
- Castillo, P. C., & Hidalgo, E. C. (2022). Leptospirosis una enfermedad zoonótica, breve revisión de la situación en el Ecuador. *Anatomía Digital*, 5(3), Article 3. <https://doi.org/10.33262/anatomiadigital.v5i3.2305>
- Cedano, J., Rodríguez, S., Kujundzic, W., Arana, J. S., Pacheco, R., & Rosso, F. (2019). Caracterización clínica de la leptospirosis grave en un hospital de alta complejidad de Cali, Colombia, 2010-2016. *Biomédica*, 39, 108-116. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i2.3985>
- Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). (2018). *Leptospirosis fact sheet for clinicians*. CDC Stacks. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/52537>
- Céspedes Zambrano, M. J., & Glenny Araujo, M. A. (2002). Manual de procedimientos bacteriológico y serológico para el diagnóstico de la leptospirosis. *Instituto Nacional de Salud*. <https://repositorio.ins.gob.pe//handle/20.500.14196/1546>
- Cheung, W. H., Wong, K.-S., Venus, L., Terence, W., & Emmie, H. (2021). A duplex qPCR assay for human erythropoietin (EPO) transgene to control gene doping in horses. *Drug Testing and Analysis*, 13(1), 113-121. <https://doi.org/10.1002/dta.2907>
- Cilia, G., Bertelloni, F., Piredda, I., Ponti, M. N., Turchi, B., Cantile, C., Parisi, F., Pinzauti, P., Armani, A., Palmas, B., Noworol, M., Cerri, D., & Fratini, F. (2020). Presence of

- pathogenic *Leptospira* spp. In the reproductive system and fetuses of wild boars (*Sus scrofa*) in Italy. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14(12), e0008982.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008982>
- De Brito, T., Silva, A. M. G. da, & Abreu, P. A. E. (2018). Pathology and pathogenesis of human leptospirosis: A commented review. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 60, e23. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201860023>
- Di Azevedo, M. I. N., Aymée, L., Borges, A. L. dos S. B., & Lilenbaum, W. (2023). Molecular Epidemiology of Pathogenic *Leptospira* spp. Infecting Dogs in Latin America. *Animals*, 13(15), Article 15. <https://doi.org/10.3390/ani13152422>
- Doi, H., Minamoto, T., Takahara, T., Tsuji, S., Uchii, K., Yamamoto, S., Katano, I., & Yamanaka, H. (2021). Compilation of real-time PCR conditions toward the standardization of environmental DNA methods. *Ecological Research*, 36(3), 379-388.
- Douchet, L., Goarant, C., Mangeas, M., Menkes, C., Hinjoy, S., & Herbreteau, V. (2022). Unraveling the invisible leptospirosis in mainland Southeast Asia and its fate under climate change. *Science of The Total Environment*, 832, 155018.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155018>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2022). *Leptospirosis Annual Epidemiological Report for 2020*. European Centre for Disease Prevention and Control: An agency of the European Union.
<https://www.ecdc.europa.eu/en/search?s=Leptospirosis>
- Farfán, M. (2015). BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADA AL DIAGNÓSTICO CLÍNICO. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(6), 788-793.
<https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2015.11.007>

- Ferreira, A. S., Costa, P., Rocha, T., Amaro, A., Vieira, M. L., Ahmed, A., Thompson, G., Hartskeerl, R. A., & Inácio, J. (2014). Direct Detection and Differentiation of Pathogenic *Leptospira* Species Using a Multi-Gene Targeted Real Time PCR Approach. *PLOS ONE*, 9(11), e112312. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112312>
- Flores, B., Halaihel, N., Pérez-Sánchez, T., Sheleby-Elías, J., Mora, B., Fuertes, H., & Jirón, W. (2020). Evaluación de tres PCR cuantitativas para la detección de leptospiras patógenas en animales domésticos en Nicaragua. *Biomédica*, 40(4), Article 4. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5170>
- Ganga-Contreras, F., Alarcón-Henríquez, N., Suárez-Amaya, W., Meleán Romero, R. A., Ruiz, G., Cueva Estrada, J., Ganga-Contreras, F., Alarcón-Henríquez, N., Suárez-Amaya, W., Meleán Romero, R. A., Ruiz, G., & Cueva Estrada, J. (2022). Causas que originan rechazo de artículos científicos en revistas científicas latinoamericanas. *Ingeniare. Revista chilena de ingeniería*, 30(3), 602-618. <https://doi.org/10.4067/S0718-33052022000300602>
- García, C. A. A. (2009). Fundamentos de genética e inmunología para bancos de sangre y medicina transfusional. *Medicina & laboratorio*, 15(01-02), 37-68.
- Gayathri, R., Archana, V., & Ramya, M. (2022). Molecular Diagnostic Methods for the Detection of Leptospirosis. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 16(2), Article 2. <https://doi.org/10.22207/JPAM.16.2.24>
- Gomes de Araújo, H., Limeira, C. H., Viviane Ferreira de Aquino, V., Longo Ribeiro Vilela, V., José Alves, C., Silvano dos Santos Higino, S., Santos, C. de S. A. B., & Azevedo, S. S. de. (2023). Global Seropositivity of Swine Leptospirosis: Systematic Review and Meta-

Analysis. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(3), Article 3.

<https://doi.org/10.3390/tropicalmed8030158>

González, H. H. S., Ferro, N. E. E., Mamani, J. S. A., Anayhuaman, M. F., Apaza, R. A., & Foraquita, R. M. A. (2021). *ELABORACION DE LAS MAQUETAS PCR Convencional y la PCR a tiempo real*.

https://www.academia.edu/download/76276703/MAQUETA_PCR_BIOTECNOLOGIA_INFORME_GRUPO_N_1.pdf

Grippi, F., Cannella, V., Macaluso, G., Blanda, V., Emmolo, G., Santangelo, F., Vicari, D., Galluzzo, P., Sciacca, C., D'Agostino, R., Giacchino, I., Bertasio, C., D'Incau, M., Guercio, A., & Torina, A. (2023). Serological and Molecular Evidence of Pathogenic *Leptospira* spp. In *Stray Dogs and Cats of Sicily (South Italy), 2017–2021*.

Microorganisms, 11(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020385>

Hamer, M., Saraullo, V., Brihuega, B., Watanabe, O., Martinez, M., & Loffler, S. G. (2019). Comparación de métodos de extracción de ADN simples y económicos para el diagnóstico molecular de leptospirosis animal. *FAVE sección Ciencias Veterinarias*, 18(2), Article 2. <https://doi.org/10.14409/favecv.v18i2.8752>

Haraji, M., Cohen, N., Hakim, K., Aziz, F., & Belahsen, R. (2011). LEPTOSPIRA: Morphology, Classification and Pathogenesis. *J Bacteriology and Parasitology ISSN:2155-9597*, 2, 2:6. <https://doi.org/10.4172/2155-9597.1000120>

Holzappel, M., Taraveau, F., & Djelouadji, Z. (2021). Serological and molecular detection of pathogenic *Leptospira* in domestic and stray cats on Reunion Island, French Indies. *Epidemiology & Infection*, 149, e229. <https://doi.org/10.1017/S095026882100176X>

- Jaimés Camargo, K. D., & Molina Puentes, M. M. (2022). *Identificación de Leptospira spp utilizando una técnica molecular de PCR convencional en caninos y felinos del Instituto Distrital de Protección y Bienestar Animal (IDPYBA)*.
<https://repository.udca.edu.co/handle/11158/4927>
- Jiménez, Á. (2022). *Situación de la leptospirosis en Europa*. ConSalud.es.
https://www.consalud.es/pacientes/infecciosas/casos-leptospirosis-europa_121718_102.html
- Kinel, G. P. (2021). *Métodos de diagnóstico directo e indirecto en Microbiología Clínica*.
- Koizumi, N. (2020). Laboratory Diagnosis of Leptospirosis. En N. Koizumi & M. Picardeau (Eds.), *Leptospira spp.: Methods and Protocols* (pp. 277-287). Springer US.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0459-5_25
- Levett, P. N. (2015). Systematics of leptospiraceae. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387, 11-20. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_2
- Luigi, T., Rojas, L., & Valbuena, O. (2015). Reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de Salmonella spp. Usando el gen invA. *Salus*, 19(3), 41-46.
- Martínez, D. G. G., & Zavala, A. M. M. (2023). Comparación de la sensibilidad y especificidad de las técnicas de laboratorio para el diagnóstico de Leishmaniasis. *Revista Científica Arbitrada Multidisciplinaria PENTACIENCIAS*, 5(3), 397-412.
- Ministerio de Salud Pública. (2023). *Sistema de vigilancia epidemiológica en Ecuador informó sobre brote de leptospirosis en Durán – Ministerio de Salud Pública* [Ministerio de Salud Pública del Ecuador]. <https://www.salud.gob.ec/sistema-de-vigilancia-epidemiologica-en-ecuador-informo-sobre-brote-de-leptospirosis-en-duran/>

- Morán, R. C. D., Corzo, E. del C. A., Arriola, N. Z., Llaja, L. C., Bravo, T. V. C., & Plasencia, C. J. T. (2022). Prevalencia y factores de riesgo de leptospirosis en la industria porcícola. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 62(3), Article 3.
- Moreno, A. (2022). Diagnóstico de la leptospirosis. *Leptospirosis*.
<https://www.webconsultas.com/salud-al-dia/leptospirosis/diagnostico-de-la-leptospirosis-9976>
- Murray, P. R., Rosenthal, K., & Pfaller, M. A. (2021). *Microbiología médica*. Elsevier Health Sciences.
- Organización Panamericana de la Salud. (2023). *Leptospirosis—OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*. Leptospirosis. <https://www.paho.org/es/temas/leptospirosis>
- Picardeau, M. (2020). Leptospira and leptospirosis. *Leptospira spp. Methods and Protocols*, 271-275.
- Podgoršek, D., Ružić-Sabljić, E., Logar, M., Pavlović, A., Remec, T., Baklan, Z., Pal, E., & Cerar, T. (2020). Evaluation of real-time PCR targeting the lipL32 gene for diagnosis of Leptospira infection. *BMC Microbiology*, 20(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01744-4>
- Rahman, M. S. A., Khor, K. H., Khairani-Bejo, S., Lau, S. F., Mazlan, M., Roslan, M. A., Ajat, M. M. M., & Noor, M. A. M. (2023). TaqMan real-time PCR for detection of pathogenic spp. In canine clinical samples. *Journal of Veterinary Research*, 67(2), 187-195.
<https://doi.org/10.2478/jvetres-2023-0024>
- Rajapakse, S. (2022). Leptospirosis: Clinical aspects. *Clinical Medicine*, 22(1), 14-17.
<https://doi.org/10.7861/clinmed.2021-0784>

- Romero-Vivas, C. M., & Falconar, A. K. (2016). *Leptospira* spp. Y leptospirosis humana. *Revista Salud Uninorte*, 32(1), Article 1. <https://doi.org/10.14482/sun.32.1.8479>
- Smythe, L., Adler, B., Hartskeerl, R. A., Galloway, R. L., Turenne, C. Y., Levett, P. N., & the International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the Taxonomy of. (2013). Classification of *Leptospira* genomospecies 1, 3, 4 and 5 as *Leptospira alstonii* sp. Nov., *Leptospira vanthielii* sp. Nov., *Leptospira terpstrae* sp. Nov. And *Leptospira yanagawae* sp. Nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt_5), 1859-1862. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.047324-0>
- Smythe, L. D., Smith, I. L., Smith, G. A., Dohnt, M. F., Symonds, M. L., Barnett, L. J., & McKay, D. B. (2002). A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infectious Diseases*, 2(1), 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-2-13>
- Sohm, C., Steiner, J., Jöbstl, J., Wittek, T., Firth, C., Steinparzer, R., & Desvars-Larrive, A. (2023). *A systematic review on leptospirosis in cattle: A European perspective* (p. 2023.03.07.531463). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.03.07.531463>
- Suárez Conejero, A. M., Otero Morales, J. M., Cruillas Miranda, S., & Otero Suárez, M. (2015). Prevención de leptospirosis humana en la comunidad. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 44(1), 86-95.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
- Tarqui-Terrones, K., Silva-Molina, J. I., Beltrán-Fabián, M., Zevallos-Vara, S., Mayta-Huatuco, E., Tarqui-Terrones, K., Silva-Molina, J. I., Beltrán-Fabián, M., Zevallos-Vara, S., & Mayta-Huatuco, E. (2019). Comparación de métodos de extracción de ADN de *Giardia*

spp. Medidos por PCR convencional. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 36(3), 423-432. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2019.363.4160>

Torres, J. M. T., Sánchez, J. G. S., Guartá, R. C. D., & Macía, J. J. P. (2020). Síndrome de Weil, leptospirosis icterica. *Medicinas UTA*, 4(1), Article 1.

Urbanskas, E., Karvelienė, B., & Radzijeuskaja, J. (2022). Leptospirosis: Classification, epidemiology, and methods of detection. A review. *Biologija*, 68(2), Article 2. <https://doi.org/10.6001/biologija.v68i2.4733>

Yescas-Benítez, J. E., Perez, N. R., Montiel-Díaz, H., Valladares-Carranza, B., Peláez-Acero, A., Morales-Ubaldo, A. L., & Bastida, A. Z. (2020). Comportamiento epidemiológico de la leptospirosis en México durante el periodo 2013-2019. *Revista de Salud Pública*, 22(4), Article 4. <https://doi.org/10.15446/rsap.v22n4.87535>

Zamora, A. J. C., Fonseca, D. C., & López, Y. G. (2020). Leptospirosis y enfermedad de Weil. *Revista Médica Sinergia*, 5(3), Article 3. <https://doi.org/10.31434/rms.v5i3.346>

Anexos

Anexo 1. Resultados de cuantificaciones de ADN de serovares *Leptospira* spp.

Resultados de cuantificaciones ADN Serovares <i>Leptospira</i> spp.				
Cuantificación Extracciones de ADN Serovares <i>Leptospira</i> spp.				
Técnica	Q1	Q2	Q3	Cod.

	(ng/μL)	(ng/μL)	(ng/μL)	Muestra
Shock Térmico	1,8	2,18	1,66	GRI 1
	2,56	2,83	2,34	GRI 2
	2,69	2,99	2,94	IC 1
	3,16	3,26	3,17	IC 2

Elaborado por: Los autores, 2023.

Anexo 2. Resultados de cuantificaciones de ADN para muestras biológicas sanguíneas y de orina con diferentes kits comerciales

Cuantificación Extracciones de ADN Muestras Biológicas							
Trat.	Kit	Tipo de muestra	Vector	Q1(ng/μL)	Q2(ng/μL)	Q3(ng/μL)	Cod. Muestra
T1	Invitrogen	Sangre	Canino	2,46	2,55	2,59	B1C4
T1	Invitrogen	Sangre	Canino	8,1	7,9	7,7	B1C8
T1	Invitrogen	Sangre	Canino	3,21	3,42	3,56	B1C26
T1	Invitrogen	Sangre	Canino	1,8	1,82	1,84	B1C28
T1	Invitrogen	Sangre	Canino	0,784	0,778	0,772	B1C33
T1	Invitrogen	Sangre	Canino	0,493	0,494	0,494	B1C37
T1	Invitrogen	Sangre	Canino	0,455	0,447	0,448	B1C38
T1	Invitrogen	Sangre	Canino	1,9	1,88	1,87	B1C42
T1	Invitrogen	Sangre	Canino	1,66	1,63	1,61	B1C43
T1	Invitrogen	Sangre	Canino	1,21	1,23	1,25	B1C44

Elaborado por: Los autores, 2023.

Cuantificación Extracciones de ADN Muestras Biológicas							
Trat.	Kit	Tipo de muestra	Hospedero	Q1(ng/μL)	Q2(ng/μL)	Q3(ng/μL)	Cod. Muestra
T2	Invitrogen	Sangre	Humano	0,532	0,536	0,54	C22P1
T2	Invitrogen	Sangre	Humano	1,21	1,18	1,15	C23P1
T2	Invitrogen	Sangre	Humano	0,47	0,463	0,464	C27P1
T2	Invitrogen	Sangre	Humano	1,25	1,05	0,896	C31P1
T2	Invitrogen	Sangre	Humano	0,48	0,474	0,47	C31P2

Elaborado por: Los autores, 2023.

Cuantificación Extracciones de ADN Muestras Biológicas

Trat.	Kit	Tipo de muestra	Vector	Q1(ng/μL)	Q2(ng/μL)	Q3(ng/μL)	Cod. Muestra
T3	Promega	Sangre	Canino	17	18	18	B1C4
T3	Promega	Sangre	Canino	0,782	0,785	0,79	B1C8
T3	Promega	Sangre	Canino	1,89	1,9	1,91	B1C26
T3	Promega	Sangre	Canino	1,01	1,02	1,02	B1C28
T3	Promega	Sangre	Canino	0,598	0,62	0,651	B1C33
T3	Promega	Sangre	Canino	1,77	1,67	1,58	B1C37
T3	Promega	Sangre	Canino	2,88	2,83	2,83	B1C38
T3	Promega	Sangre	Canino	1,96	2,03	2,06	B1C42
T3	Promega	Sangre	Canino	2,65	2,52	2,44	B1C43
T3	Promega	Sangre	Canino	0,873	0,873	0,865	B1C44

Elaborado por: Los autores, 2023.

Cuantificación Extracciones de ADN Muestras Biológicas

Trat.	Kit	Tipo de muestra	Hospedero	Q1(ng/μL)	Q2(ng/μL)	Q3(ng/μL)	Cod. Muestra
T4	Promega	Sangre	Humano	0,759	0,834	0,888	C22P1
T4	Promega	Sangre	Humano	0,519	0,496	0,483	C23P1
T4	Promega	Sangre	Humano	2,27	2,27	2,28	C27P1
T4	Promega	Sangre	Humano	0,821	0,818	0,814	C31P1
T4	Promega	Sangre	Humano	1,16	1,15	1,15	C31P2

Elaborado por: Los autores, 2023.

Cuantificación Extracciones de ADN Muestras Biológicas

Trat.	Kit	Tipo de muestra	Vector	Q1(ng/μL)	Q2(ng/μL)	Q3(ng/μL)	Cod. Muestra
T5	QIAGEN	Sangre	Canino	1,25	1,25	1,31	LP38S
T5	QIAGEN	Sangre	Canino	31	32	33	LP40S
T5	QIAGEN	Sangre	Canino	1,1	1,02	1,09	LP41S
T5	QIAGEN	Sangre	Canino	0,81	1,21	0,98	LP49S
T5	QIAGEN	Sangre	Canino	13	11	9	LP55S
T5	QIAGEN	Sangre	Canino	5,7	4,91	3,85	LP59S
T5	QIAGEN	Sangre	Canino	40	39	39	LP66S
T5	QIAGEN	Sangre	Canino	19	18	18	LP67S

T5	QIAGEN	Sangre	Canino	13	12	12	LP68S
T5	QIAGEN	Sangre	Canino	7,5	7,1	6,8	LP69S

Elaborado por: Los autores, 2023.

Cuantificación Extracciones de ADN Muestras Biológicas							
Trat.	Kit	Tipo de muestra	Hospedero	Q1(ng/μL)	Q2(ng/μL)	Q3(ng/μL)	Cod. Muestra
T6	QIAGEN	Orina	Canino	0	0	0	LP38O
T6	QIAGEN	Orina	Canino	0	0	0	LP40O
T6	QIAGEN	Orina	Canino	0,236	0,21	0,161	LP41O
T6	QIAGEN	Orina	Canino	2,21	2,58	2,6	LP49O
T6	QIAGEN	Orina	Canino	0,0612	0,072	0,083	LP55O
T6	QIAGEN	Orina	Canino	0	0	0	LP59O
T6	QIAGEN	Orina	Canino	0,11	0,012	0,0028	LP66O
T6	QIAGEN	Orina	Canino	0,0632	0,0699	0,0889	LP67O
T6	QIAGEN	Orina	Canino	0,26	0,249	0,232	LP68O
T6	QIAGEN	Orina	Canino	0	0	0	LP69O

Elaborado por: Los autores, 2023.

Anexo 3. Características de primers y sondas empleadas para estandarización de protocolo qPCR

Gen	Descripción	Nombre	Secuencia (5' - 3')	T° de anillado	Conc. μM	Long. pb	Referencia
β-actina	gen β-actina de mamíferos	F_β-actina	GGC TCY ATY CTG GCC TC	60°C	10		(Ferreira et al., 2014)
		R_β-actina	GCA YTT GCG GTG SAC RAAT G		10		
		S_β-actina	TAC TCC TGC TTG CTG ATC CAC ATC		10		

Lip32	gen <i>Lip32</i> de <i>Leptospiras</i> patógenas	F_lip32	AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG		10	242	
		R_lip32	GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT	60°C	10		
		S_lip32	AAA GCC AGG ACA AGC GCC G		10		
SecY	gen <i>secY</i> de <i>L. interrogans</i>	F_secY	CTT GAG CCT GCG CGT TAY C		10	176	
		R_secY	CCG ATA ATT CCA GCG AAG ATC	63°C	10		
		S_secY	CTC ATT TGG TTA GGA GAA CAG ATC A		10		
rrs (16s)	gen <i>rrs</i> (16s) de <i>Leptospiras</i> patógenas	F_16s	5 ¹⁷¹ CCCGCGTCCGATTAG 3'		10	89	(Smythe et al., 2002)
		R_16s	5 ²⁵⁸ TCCATTGTGGCCGR ^{A/G} ACAC3	60°C	10		
		S_16s	5 ²⁰⁵ CTCACCAAGGCGACGATCGGTAGC ²²⁸ 3'		10		

Elaborado por: Los autores, 2023.

Anexo 4. Resultados de CT de Tratamientos aplicados con muestras biológicas de sangre

Resultados qPCR TRIPLEX LIP32 - Muestras Biológicas de Caninos										
Prueba	Cód. Muestra	CT de Muestras amplificadas - FAM			CT de Muestras amplificadas – HEX			CT de Muestras amplificadas - CY5		
		CT1	CT2	CT3	CT1	CT2	CT3	CT1	CT2	CT3
PLip32	LP38S	0	0	0	0	0	0	21,57	21,49	21,47
PLip32	LP40S	0	0	0	0	0	0	19,83	19,81	19,76

PLip32	LP41S	0	0	0	0	0	0	20,71	20,68	20,65
PLip32	LP49S	0	33,77	0	19,67	0	0	19,34	18,75	18,68
PLip32	LP55S	34,23	34,26	34,01	33,78	34,27	34,02	19,82	19,75	19,72
PLip32	LP59S	34,15	34,58	33,71	34,52	34,34	33,87	19,94	19,96	19,95
PLip32	LP66S	0	0	34,67	34,5	34,98	34,2	18,09	19,33	19,33
PLip32	LP67S	33,34	33,57	33,8	33,91	34,19	34,17	18,82	18,82	19,2
PLip32	LP68S	0	0	34,69	14,87	34,74	33,66	16,33	19,3	19,25
PLip32	LP69S	26,945	33,24	20,65	0	0	0	20,8	20,7	20,84

Elaborado por: Los autores, 2023.

Resultados qPCR TRIPLEX 16S - Muestras Biológicas de Caninos

Prueba	Cód. Muestra	CT de Muestras amplificadas - FAM			CT de Muestras amplificadas - HEX			CT de Muestras amplificadas - CY5		
		CT1	CT2	CT3	CT1	CT2	CT3	CT1	CT2	CT3
P16s	LP55S	36,61	35,24	36,36	0	0	0	19,97	20,64	15,69
P16s	LP59S	35,73	35,74	35,75	33,39	0	32,14	19,76	19,94	20,12
P16s	LP66S	35,71	36,75	36,18	0	31,85	0	19,24	19,33	19,31
P16s	LP67S	35,19	34,9	35,59	0	0	0	18,35	18,2	18,84
P16s	LP68S	38,09	37,13	37,01	0	0	0	19,02	19,24	19,46
P16s	LP69S	36,64	40	36,93	33,73	30,85	8,93	21,02	20,66	20,92
P16s	LP38S	0	0	0	0	0	0	21,43	21,55	21,55
P16s	LP41S	0	0	0	0	0	0	20,51	20,66	15,53
P16s	LP40S	0	0	0	0	0	0	19,69	19,05	19,67
P16s	LP49S	34,74	38,1	37,27	0	0	0	18,3	18,73	20,64

Elaborado por: Los autores, 2023.

Curvas de Amplificación – prueba PLip32 – Canal FAM (*Lip32*)

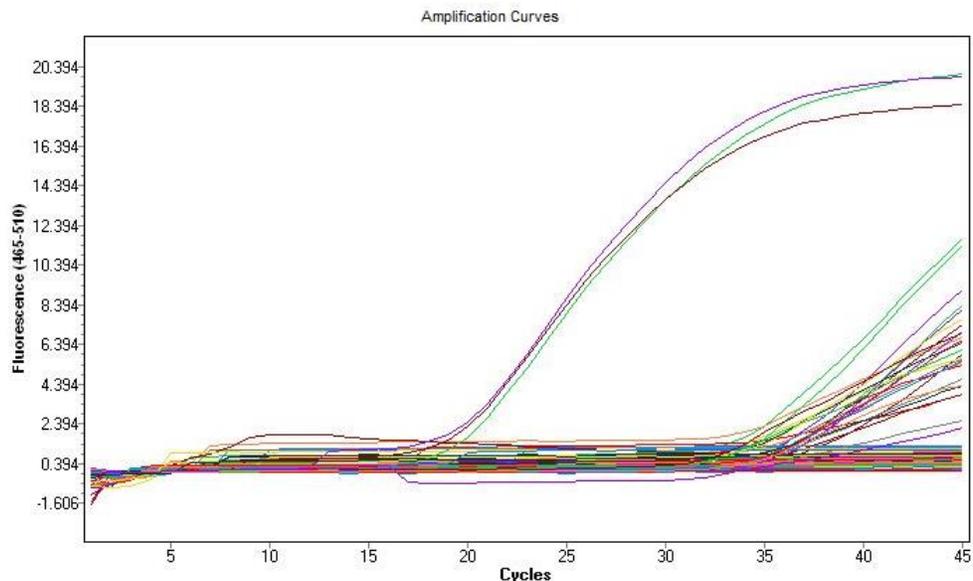


Figura 9. Curvas de fluorescencia vs Número de ciclos del canal FAM para el gen *Lip32* - Triplex prueba PLip32

Elaborado por: LightCycler Roche System, 2023

Amplificación – prueba pLip32 – Canal HEX (*secY*)

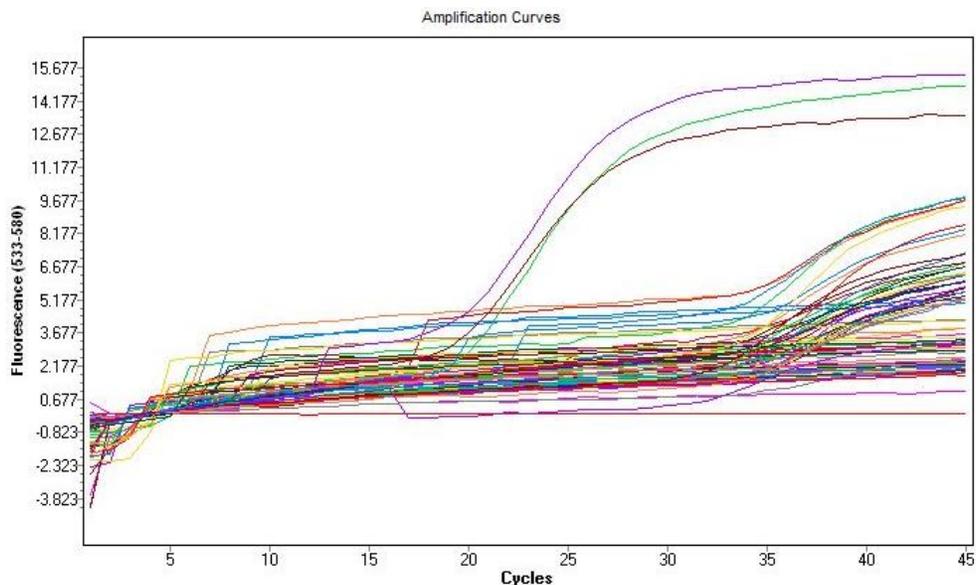


Figura 10. Curvas de fluorescencia vs Número de ciclos del canal HEX para el gen *secY* - Triplex prueba PLip32

Elaborado por: LightCycler Roche System, 2023

Curvas de Amplificación – prueba PLip32 – Canal CY5 (β -actina)

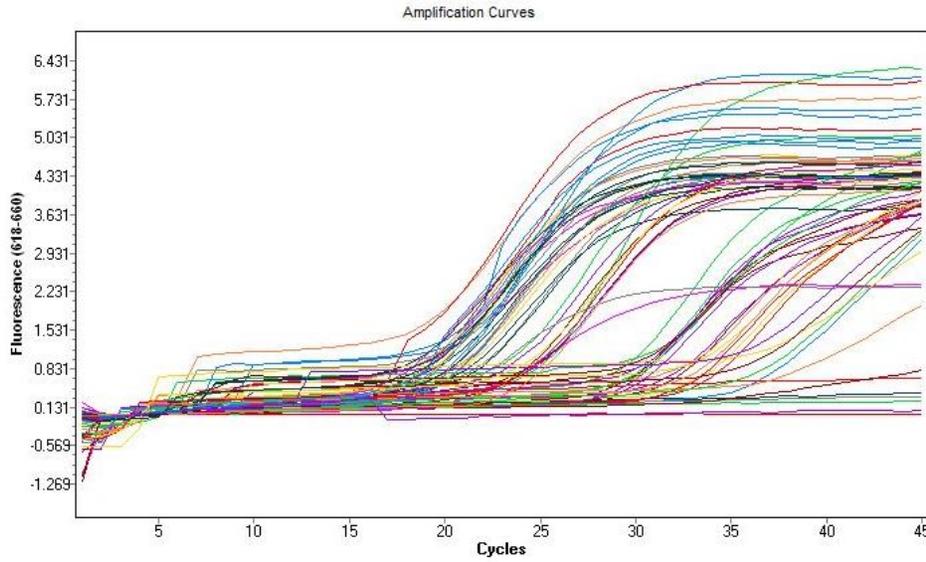


Figura 11. Curvas de florescencia vs Número de ciclos del canal CY5 para el gen b-actina - Triplex prueba PLip32

Elaborado por: LightCycler Roche System, 2023

Curvas de Amplificación – prueba P16s – Canal CY5 (β -actina)

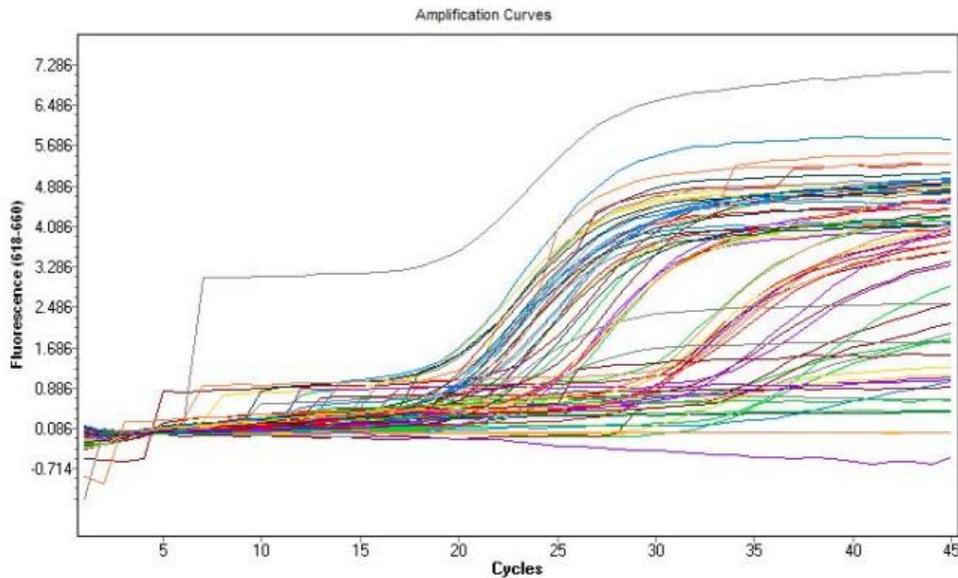


Figura 12. Curvas de florescencia vs Número de ciclos del canal CY5 para el gen b-actina - Triplex prueba P16s

Elaborado por: Los autores, 2023

Curvas de Amplificación – prueba P16s – Canal HEX (*secY*)

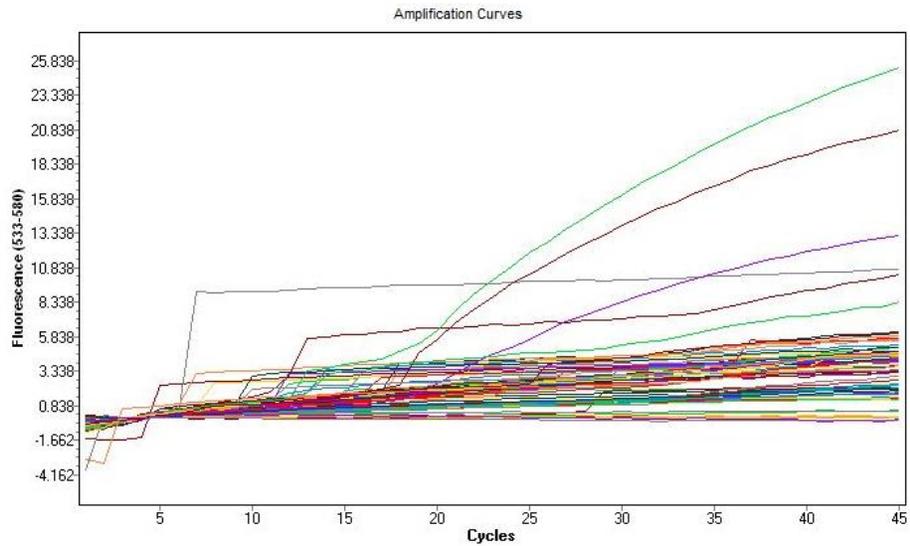


Figura 13. Curvas de fluorescencia vs Número de ciclos del canal HEX para el gen *secY* - Triplex prueba P16s

Elaborado por: LightCycler Roche System, 2023

Curvas de Amplificación – prueba P16s – Canal FAM (*rrs 16S*)

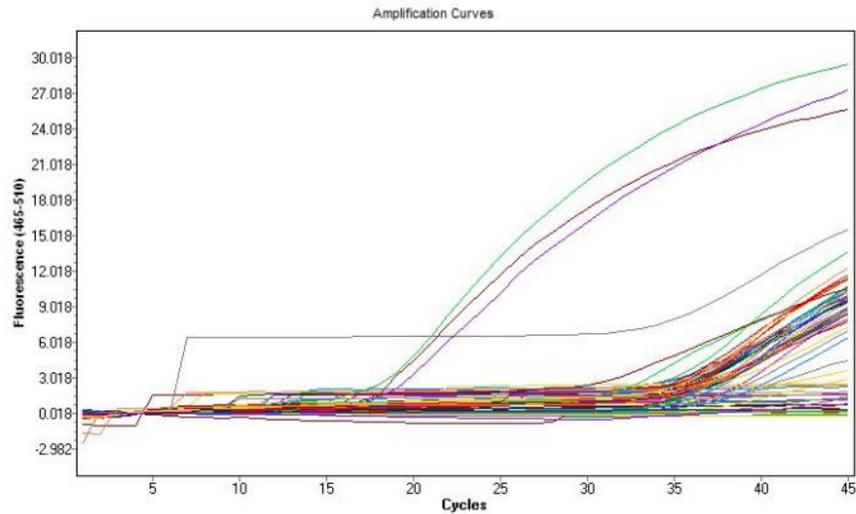


Figura 14. Curvas de fluorescencia vs Número de ciclos del canal FAM para el gen *rrs 16S* - Triplex prueba P16s

Elaborado por: LightCycler Roche System, 2023

Anexo 5. Resultados obtenidos con el programa estadístico *InfoStat*, versión 2020

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Q (ng/uL)	T1	15	2,57	2,38	1,82	43,68	<0,0001
Q (ng/uL)	T2	15	0,74	0,33	0,54		
Q (ng/uL)	T3	15	2,80	4,27	1,91		
Q (ng/uL)	T4	15	1,11	0,64	0,83		
Q (ng/uL)	T5	15	11,92	13,01	7,50		
Q (ng/uL)	T6	15	0,39	0,82	0,06		

Trat. Medias Ranks

T6	0,39	15,40	A
T2	0,74	31,47	A B
T4	1,11	41,73	B C
T1	2,57	56,80	C D
T3	2,80	57,77	C D
T5	11,92	69,83	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Fuente: *Infostat*, 2023

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3144,88	5	628,98	15,84	<0,0001
Tratamiento	3144,88	5	628,98	15,84	<0,0001
Error	5719,19	144	39,72		
Total	8864,07	149			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,36480

Error: 39,7166 gl: 144

Tratamiento	Medias	n	E.E.
T6	0,31	30	1,15 A
T2	0,74	15	1,63 A
T4	1,11	15	1,63 A
T1	2,21	30	1,15 A
T3	3,19	30	1,15 A
T5	12,83	30	1,15 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Fuente: *Infostat*, 2023

Anexo 6. Kits comerciales de extracción de ADN y equipos para detección molecular disponibles en INSPI



Figura 15. Tubos recolectores y columnas giratorias para extracción de ADN

Fuente: (Tarqui-Terrones et al., 2019)



Figura 16. Fluorímetro Quantus™ Fluorometer con su NGS Starter Package para cuantificación de ADN

Fuente: (Promega Corporation, 2023)



Figura 17. Termociclador LightCycler® 480 II con su software de manejo respectivo

Fuente: F. Hoffmann - Roche Ltd, (2023)



Figura 18. Kit de extracción Invitrogen PureLink® Genomic DNA MiniKit

Elaborado por: Los autores, 2023.



Figura 19. Kit de extracción Wizard® SV Genomic DNA Purification System

Elaborado por: Los autores, 2023.

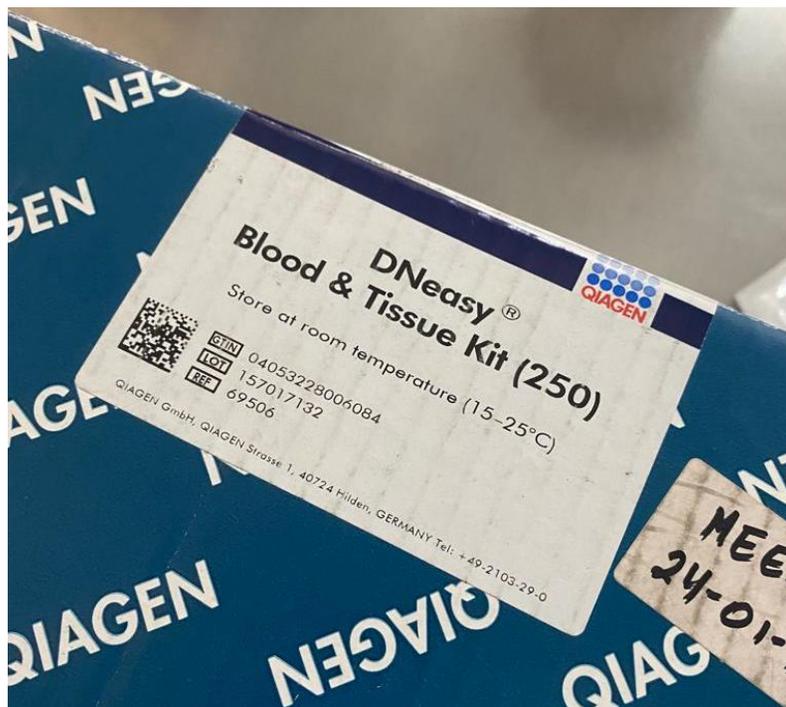
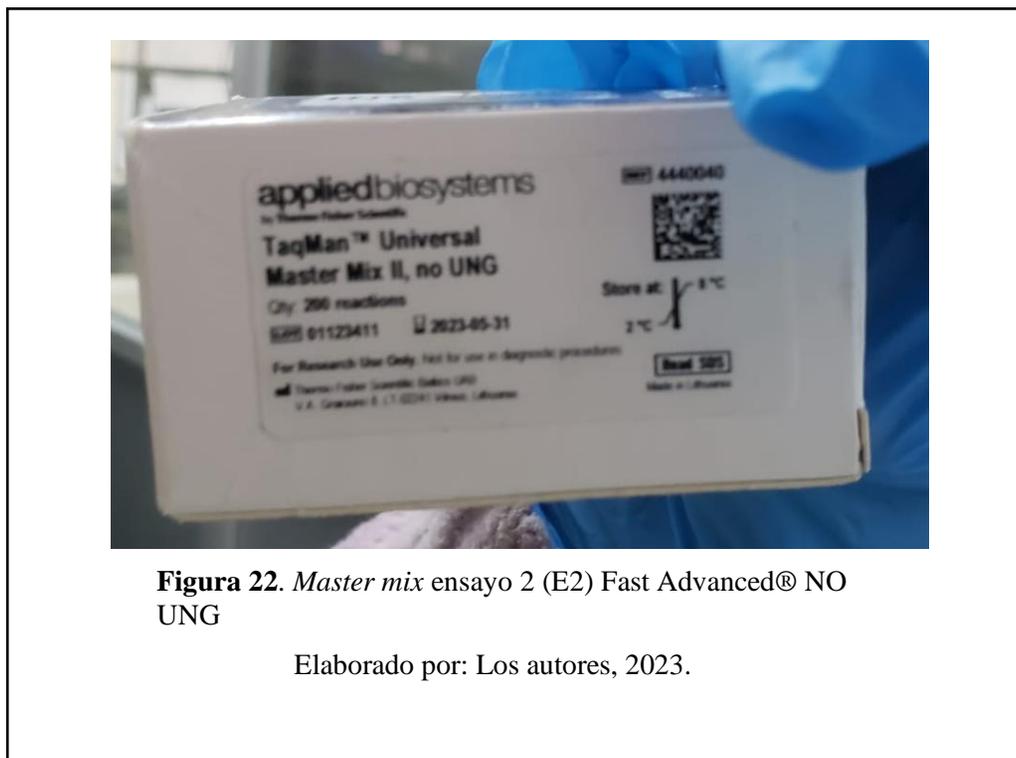
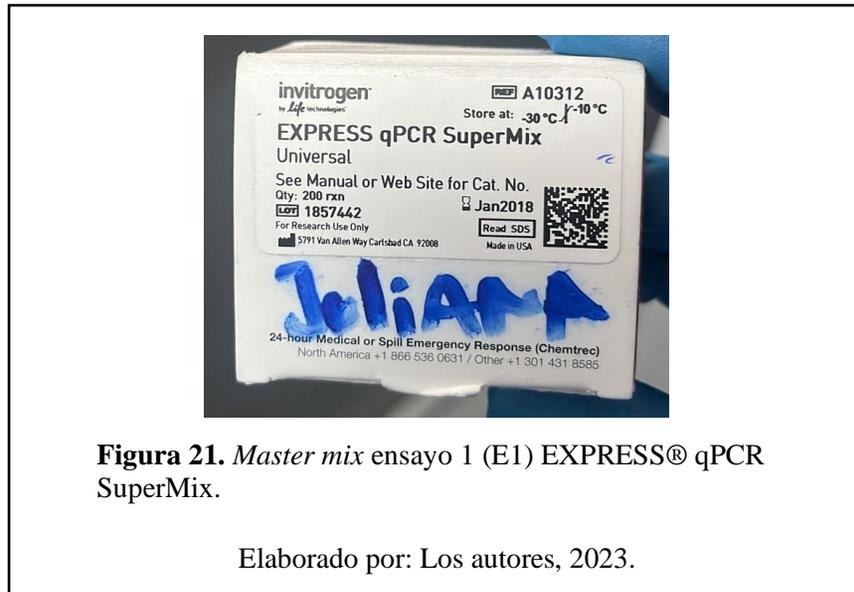


Figura 20. Kit de extracción QIAGEN® DNeasy® Blood & Tissue Kit

Elaborado por: Los autores, 2023.

Anexo 7. Kits de *Master mix* utilizados para ensayos qPCR disponibles en INSPI, utilizados en el trabajo experimental



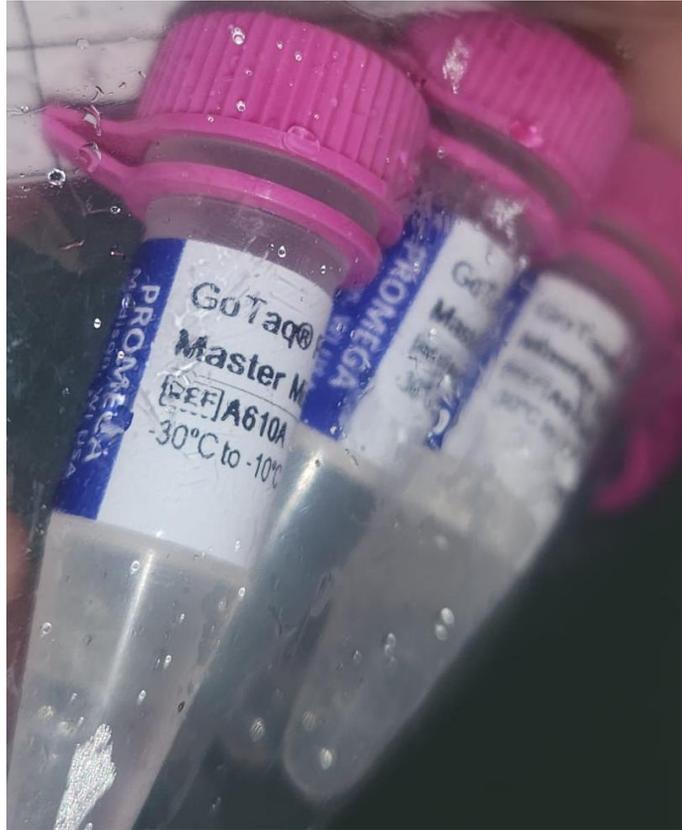


Figura 23. Master mix para ensayos: E3, E4, E5 GoTaq® MasterMix

Elaborado por: Los autores, 2023.

Anexo 8. Obtención de ADN realizado en el Área de extracción y purificación del Laboratorio de Investigaciones Multidisciplinarias – INSPI

