

## Información Importante

La Universidad de La Sabana informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad de La Sabana.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan finalidad académica, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, La Universidad de La Sabana informa que los derechos sobre los documentos son propiedad de los autores y tienen sobre su obra, entre otros, los derechos morales a que hacen referencia los mencionados artículos.

**BIBLIOTECA OCTAVIO ARIZMENDI POSADA**  
UNIVERSIDAD DE LA SABANA  
Chía - Cundinamarca



El presente formulario debe ser diligenciado en su totalidad como constancia de entrega del documento para ingreso al Repositorio Digital (Dspace).

<b>TITULO</b>	EVALUACIÓN DEL MEDIO EMJH CONVENCIONAL Y MODIFICADO SOBRE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y		
	LA EXPRESIÓN DE GENES DE PATOGENICIDAD EN CEPAS DE <i>Leptospira interrogans</i> serovar Icterohaemorrhagiae		
<b>SUBTITULO</b>			
<b>AUTOR(ES)</b> Apellidos, Nombres (Completo) del autor(es) del trabajo	SANTOS ARIAS, ROSARIO		
<b>PALABRAS CLAVE</b> (Mínimo 3 y máximo 6)	<i>Leptospira interrogans</i>		<i>lipL32</i>
	<i>cinética</i>		<i>ompL1</i>
	<i>EMJH</i>		<i>Expresión</i>

<b>RESUMEN DEL CONTENIDO</b> (Mínimo 80 máximo 120 palabras)	<p>La leptospirosis es una enfermedad zoonótica producida por espiroquetas patógenas del género <i>Leptospira</i> spp son de crecimiento lento debido a que son exigentes nutricionalmente. En este estudio se determinó el efecto del medio de cultivo EMJH convencional y modificado sobre la cinética de crecimiento y la expresión de genes asociados con patogenicidad en dos cepas de <i>Leptospira interrogans</i> serovar Icterohaemorrhagiae. La metodología comprendió la realización de pruebas físicoquímicas y microbiológicas de los suplementos convencional y modificado.</p> <p>Se estimó el crecimiento microbiano en el medio de cultivo EMJH bajo condiciones estáticas y de agitación por espectrofotometría y la uniformidad celular con microscopio de campo oscuro. El estudio molecular se realizó identificando los genes <i>lipL32</i> y <i>ompL1</i> en tres puntos de la cinética de crecimiento (fase de adaptación, fase exponencial y fase de declive) por PCR convencional y la expresión del gen <i>lipL32</i> por PCR en Tiempo Real. Los resultados físicoquímicos de los suplementos mostraron diferencias significativas (<math>p &lt; 0.05</math>). La evaluación microbiológica para mesófilos, mohos y levaduras, coliformes y <i>S. aureus</i>, fue de U.F.C/ mL &lt; 10 y ausencia de <i>Salmonella spp</i> y <i>Listeria monocytogenes</i>. Los resultados en la cinética de crecimiento y el estudio molecular en la cepa aislada y control ATCC (23581) de <i>Leptospira interrogans</i> serovar Icterohaemorrhagiae en el medio modificado y convencional bajo la condición estática y agitado, indicaron que se obtuvo un adecuado rendimiento celular, se verificó la presencia de los genes <i>lipL32</i> y <i>ompL1</i> y la expresión del gen <i>lipL32</i>. Este trabajo se presenta como una contribución en el desarrollo de nuevos medios de cultivo, bajo en proteínas, que permitan el crecimiento y mantenimiento de las cepas de <i>Leptospira interrogans</i> serovar Icterohaemorrhagiae en EMJH modificado, sin afectar la expresión de genes asociados con patogenicidad, donde se utilizó como suplemento un subproducto industrial de desecho (sujeto a patente), beneficiando a la comunidad científica y al sector industrial productor de vacunas.</p>		
---	---	--	--

Autorizo (amos) a la Biblioteca Octavio Arizmendi Posada de la Universidad de La Sabana, para que con fines académicos, los usuarios puedan consultar el contenido de este documento en las plataformas virtuales de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

**EVALUACIÓN DEL MEDIO EMJH CONVENCIONAL Y MODIFICADO  
SOBRE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y LA EXPRESIÓN  
DE GENES DE PATOGENICIDAD EN CEPAS DE  
*Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae**

**ROSARIO SANTOS ARIAS**

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA  
MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS  
ENFASIS: BIOPROCESOS  
CHÍA, CUNDINAMARCA  
2012**

**EVALUACIÓN DEL MEDIO EMJH CONVENCIONAL Y MODIFICADO  
SOBRE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y LA EXPRESIÓN  
DE GENES DE PATOGENICIDAD EN CEPAS DE  
*Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae**

**ROSARIO SANTOS ARIAS**

**Trabajo de grado como requisito para optar el título de:  
Magister en Diseño y Gestión de Procesos  
Énfasis: Bioprocesos**

**Directora:  
PATRICIA HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ  
Especialista en Epidemiología. UR  
Magíster en Biología. PUJ**

**Co-Director:  
LUIS EDUARDO DÍAZ BARRERA Ph.D  
Químico. U. Nal.**

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA  
MAESTRIA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS  
CHÍA, CUNDINAMARCA  
2012**

**APROBACIÓN**

-----  
**FIRMA DIRECTORA**

-----  
**FIRMA CODIRECTOR**

-----  
**FIRMA JURADO**

-----  
**FIRMA JURADO**

-----  
**FIRMA JURADO**

## DEDICATORIA

Este trabajo se lo quiero dedicar en primera instancia a un amigo especial que me escucha en lo secreto y sabe de mis angustias y necesidades, no me reprocha, pero si me corrige, es un amigo fiel, en quien siempre he confiado, que lo amo con toda mi alma y que gracias a Él, se pudo realizar este trabajo. Este es mi amigo: **Dios**

También se lo dedico a mis hijos Daniela Figueroa y Juan Pablo Figueroa, que los amo con toda mi alma y mí ser ya que son parte de mi existencia y son el futuro de mis proyecciones. A mi amado Esposo Isaías Figueroa quien con su amor, apoyo y constante compañía me da voz de aliento para salir adelante. A mis Padres, Hilda Arias y Alfonso Santos, y hermanos Lucia, Luis Eduardo y Carlos Alfonso Santos porque siempre han querido lo mejor para mí. A la Directora Patricia Hernández, porque es una persona con un gran corazón, lleno de bondad y amor; de quien he aprendido por su gran experiencia como investigadora, sus valiosos y enriquecedores conocimientos, además, de la disciplina, organización y el interés por la investigación.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a Dios, por haber puesto en mi camino valiosas personas que con el apoyo y el tiempo dedicado por todos ellos, siempre estuvieron conmigo e hicieron posible este trabajo de investigación. Agradezco desde lo más profundo de mi corazón a mis amigos de la Universidad de La Salle:

Dr. Ricardo Montealegre, por ayudarme cuando más lo necesite brindándome su apoyo incondicional, por todos sus consejos que marcaron huella en mi corazón y darme una luz de esperanza al final del túnel.

Dra. Patricia Jiménez de Borray. Directora del Departamento de Ciencias Básicas, por su apoyo en la realización de este trabajo.

Dra. Patricia Hernández, por su dedicación, tiempo y sus conocimientos producto de la experiencia, que ayudaron a mi formación académica.

Dra. Arlen Patricia Gómez, por brindarme sus conocimientos, por su valioso tiempo y por su apoyo constante para la realización de este trabajo.

Dra. Diana Pachón y Iovana Castellanos, quienes han estado en todo momento apoyando este trabajo con sus buenos consejos y sus palabras de aliento a mi corazón.

Dra. Rita Baldrich por haber permitido desarrollar el estudio molecular en PCR en tiempo real.

Dra. Gladys Quintero por sus valiosos conocimientos.

A mis compañeros y amigos, Juan Carlos Poveda Pisco, por sus conocimientos y el tiempo dedicado; a William David Quintero, Sofía Cárdenas, Luz Mary Figueroa, Lionel Sánchez, Yaneth Sabogal, Freddy Daza, y María Nimisica.

Agradezco de todo corazón a la Universidad de La Sabana:

Dr. Luis Eduardo Díaz, por su dedicación, conocimientos y paciencia. Dra. Clementina Cueto, por su constante apoyo y al Ingeniero Andrés Ramos, porque siempre escucharon los obstáculos que tuve para la realización de otros trabajos de investigación y me brindaron la confianza y la motivación para lograr la culminación de este trabajo de grado. A los jurados Dra. Catalina Aguilar. Dra. Erlide Prieto y Dra. Ligia Sánchez por sus valiosas observaciones.

A mi bella familia, mi esposo, mis lindos hijos, mis padres, hermanos, mi suegra, mis cuñados, sobrinos y cody.

**Dios los Bendiga y haga prosperar siempre sus caminos.**

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	1
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	5
2. OBJETIVOS.....	9
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	9
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	10
3.1. Generalidades e importancia de la Leptospirosis.....	10
3.2. Características de <i>Leptospira</i> spp.....	12
3.3. Requerimiento nutricional para el cultivo <i>in vitro</i> de <i>Leptospira</i> spp .....	13
3.3.1. Componentes químicos suplemento convencional.....	16
3.3.2. Componentes químicos suplemento modificado.....	18
3.3.3. Relación de costos de mantenimiento de <i>Leptospira</i> spp <i>in vitro</i> .....	19
3.4. Cinética de crecimiento bacteriano.....	20
3.4.1. Fases de la curva de crecimiento bacteriano.....	20
3.4.2. Parámetros cinéticos de crecimiento.....	23
3.5. Métodos de diagnóstico directo, serológico y molecular.....	26
3.6. Aspectos moleculares.....	28
4. METODOLOGÍA.....	31
4.1. Obtención del suplemento modificado y convencional.....	31
4.2. Evaluación físico-química y microbiológica del suplemento convencional y modificado.....	31
4.2.1. Evaluación físico-química.....	31



4.2.2. Evaluación microbiológica del suplemento convencional y modificado....	32
4.3. Cinética de crecimiento de <i>Leptospira interrogans</i> serovar Icterohaemorrhagiae, en medio de cultivo EMJH convencional y modificado bajo condiciones de crecimiento estático y de agitación.....	32
4.3.1. Activación de cepas y cultivo estático.....	32
4.3.2. Cultivo agitado.....	34
4.4. Estudio molecular.....	35
4.4.1. Identificación de los genes <i>ompL1</i> y <i>lipL32</i> .....	35
4.4.2. Retrotranscripción o generación de DNA complementario.....	35
4.4.3. PCR convencional y PCR en Tiempo Real.....	36
4.5. Modelo estadístico.....	37
5. RESULTADOS.....	39
5.1. Evaluación físico-química y microbiológica del suplemento convencional y modificado.....	39
5.1.1. Obtención de los suplementos.....	39
5.1.2. Evaluación físico-química del suplemento convencional y modificado.....	40
5.1.3. Evaluación microbiológica de los suplementos.....	41
5.2. Cinética de crecimiento de <i>Leptospira interrogans</i> serovar Icterohaemorrhagiae en medio de cultivo EMJH convencional y modificado bajo condiciones de crecimiento estático y de agitación.....	41
5.2.1. Estudio molecular.....	44
6. DISCUSIÓN.....	51
7. CONCLUSIONES.....	61
8. PROYECCIONES.....	63
9. RECOMENDACIONES.....	64
LISTA DE REFERENCIAS.....	65
ANEXOS.....	85

## LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Relación de costos para el mantenimiento <i>Leptospira</i> spp <i>in vitro</i> .....	19
Tabla 2. Métodos de Identificación directa de <i>Leptospira</i> spp.....	26
Tabla 3. Codificación de las muestras para manejo de datos.....	34
Tabla 4. Control de sesgos.....	37
Tabla 5. Plan de análisis general.....	38
Tabla 6. Resultados de pruebas de porcentaje de humedad, cenizas y grasas del suplemento modificado y convencional.....	40
Tabla 7. Parámetros de crecimiento evaluados en las cepas de <i>Leptospira</i> <i>Interrogans</i> serovar Icterohaemorrhagiae durante el cultivo estático.....	42
Tabla 8. Parámetros de crecimiento evaluados en las cepas de <i>Leptospira</i> <i>Interrogans</i> serovar Icterohaemorrhagiae durante el cultivo agitado.....	43
Tabla 9. Expresión del RNA del gen <i>lipL32</i> normalizados con el gen <i>rrl</i> (housekeeping o normalizador).....	49

## LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Leptospiras aisladas de bovinos.....	11
Figura 2. <i>Leptospira interrogans</i> con flagelos periplásmicos.....	13
Figura 3. Crecimiento de <i>Leptospira interrogans</i> spp en medio de cultivo semisólido EMJH.....	14
Figura 4. Suplemento convencional en el medio EMJH.....	17
Figura 5. Representación gráfica del crecimiento y curva de crecimiento bacteriano.....	21
Figura 6. Pared celular de bacterias Gram-negativas y proteínas de membrana externa.....	29
Figura 7 Crecimiento exponencial de las cepas de <i>Leptospira interrogans</i> serovar Icterohaemorrhagiae en el medio EMJH modificado y convencional condiciones estáticas .....	42
Figura 8 Crecimiento exponencial de las cepas de <i>Leptospira interrogans</i> serovar Icterohaemorrhagiae en el medio EMJH modificado y convencional condiciones de agitación.....	43
Figura 9. Observación del crecimiento de <i>Leptospira interrogans</i> serovar Icterohaemorrhagiae en microscopio de campo oscuro (40X) cepa control medio convencional (Lic2A) y medio modificado (Lic2B).	44
Figura 10. Electroforesis de los productos amplificados del gen <i>lipL32</i> en muestras de cultivo de <i>L. interrogans</i> serovar Icterohaemorrhagiae del estudio piloto.....	45
Figura 11. Electroforesis productos amplificados de los genes <i>rrl</i> (482 pb), <i>lipL32</i> (423 pb) y <i>ompL1</i> (960 pb) de cepas de <i>Leptospira interrogans</i> serovar Icterohaemorrhagiae.....	46
Figura 12. Productos amplificados del gen <i>lipL32</i> (423 pb) y <i>ompL1</i> (960 pb) en <i>Leptospira interrogans</i> serovar Icterohaemorrhagiae.....	47
Figura 13. Curvas de disociación ( <i>melting curve</i> o <i>Tm</i> ) de los genes <i>lipL32</i> (84 °C) y <i>rrl</i> (86 °C).....	48
Figura 14. Electroforesis del gen <i>lipL32</i> (423 pb) en muestras de cultivo de <i>Leptospira interrogans</i> serovar Icterohaemorrhagiae.....	50

## LISTA DE ANEXOS

	Pág
Anexo 1. Procedimiento para la determinación de proteínas por el método de Biuret en el suplemento modificado y convencional.....	86
Anexo 2. Determinación de proteína total y compuestos nitrogenados por el método de Kjeldhal.....	92
Anexo3. Procedimiento para la determinación de azúcares totales y reductores Del suplemento modificado y convencional.....	95
Anexo 4. Procedimiento para la determinación del porcentaje de humedad y cenizas del suplemento modificado y convencional.....	98
Anexo 5. Procedimiento para la determinación del porcentaje de grasa del suplemento modificado y convencional .....	101
Anexo 6. Resultados estadísticos para las pruebas químicas en los dos suplementos modificado y convencional.....	103
Anexo 7. Procedimiento para la evaluación microbiológica del suplemento modificado y convencional.....	107
Anexo 8. Procedimiento preparación de diluciones e inoculación en medios de cultivo para recuento microbiano del suplemento modificado y convencional .....	108
Anexo 9. Determinación número más probable (NMP) coliformes totales y fecales...	111
Anexo 10. Procedimiento preparación medio de cultivo EMJH.....	113
Anexo 11. Estudio piloto para la estandarización del protocolo de extracción de RNA bacteriano, Retrotranscripción, PCR convencional y PCR en Tiempo Real.....	114
Anexo 12. Ficha técnica suplemento convenciona.....	116
Anexo 13. Cultivo estático. Cepa aislada EMJH convencional- Lic1A.....	118
Anexo 14. Cultivo estático. Cepa control EMJH convencional- Lic2A.....	121
Anexo 15. Cultivo estático. Cepa aislada EMJH modificado – Lic1B.....	124
Anexo 16. Cultivo estático. Cepa control EMJH modificado- Lic2B.....	127

Anexo 17. Resultados estadísticos del crecimiento bacteriano en los medios EMJH convencional y modificado bajo condiciones estáticas.....	130
Anexo 18. Cultivo agitado. Cepa aislada EMJH convencional- Lic1AC.....	135
Anexo 19. Cultivo agitado. Cepa control EMJH convencional- Lic2AC.....	138
Anexo 20. Cultivo agitado. Cepa aislada EMJH modificado – Lic1BC.....	141
Anexo 21. Cultivo agitado. Cepa control EMJH modificado- Lic2BC.....	144
Anexo 22. Resultados estadísticos del crecimiento bacteriano en los medios EMJH convencional y modificado bajo condiciones de agitación.....	147
Anexo 23. Resultados directos del trabajo.....	151

## RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica e infecciosa emergente, suele ser confundida con otras patologías infecciosas por lo que se requiere del aislamiento de la bacteria en medios de cultivo y un diagnóstico serológico y molecular confiable. Es producida por espiroquetas patógenas del género *Leptospira* spp que son microorganismos de crecimiento lento con requerimientos nutricionales exigentes y diferentes para cada serovar. En este estudio se determinó el efecto del medio de cultivo EMJH convencional y modificado sobre la cinética de crecimiento y la expresión de genes asociados con patogenicidad en dos cepas de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. La metodología utilizada comprendió la realización de pruebas fisicoquímicas y microbiológicas de los suplementos convencional y modificado que fueron utilizados en el medio de cultivo sintético EMJH bajo condiciones estáticas y de agitación. En ambas condiciones de cultivo se estimó el crecimiento microbiano por espectrofotometría y se verificó la uniformidad celular, utilizando un microscopio de campo oscuro. El estudio molecular se realizó identificando los genes *lipL32* y *ompL1* en tres puntos de la cinética de crecimiento (fase de adaptación, fase exponencial y fase de declive) por PCR convencional y se determinó la expresión del gen *lipL32* por PCR en Tiempo Real en los mismos puntos escogidos de la cinética de crecimiento. Los resultados fisicoquímicos mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los suplementos convencional y modificado ( $p < 0.05$ ). La evaluación microbiológica de los suplementos fue de U.F.C./mL < 10 para mesófilos aerobios viables, mohos y levaduras, coliformes totales y fecales, *S. aureus* coagulasa positivo y ausencia de patógenos como *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes*. Los resultados en la cinética de crecimiento de las cepas de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae, indicaron que bajo la condición estática y agitada se obtuvo un adecuado rendimiento celular, en los medios EMJH seleccionados. Los resultados del estudio molecular mostraron la presencia de los genes *lipL32* y *ompL1* en las cepas de estudio y en la expresión génica se evidenció que el gen *lipL32* se expresó en la cepa aislada y control ATCC (23581) en el medio modificado y convencional bajo las condiciones planteadas experimentalmente. Con los resultados obtenidos se logró mantener la viabilidad de las cepas de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae en EMJH modificado, con una respuesta adaptativa al nuevo medio, donde se utilizó como suplemento un subproducto industrial de desecho (sujeto a patente). Este trabajo se presenta como una contribución en el desarrollo de nuevos medios de cultivo, bajos en proteínas, que permitan el crecimiento y mantenimiento de cepas de *Leptospira* spp sin afectar la expresión de genes asociados con patogenicidad beneficiando a la comunidad científica y al sector industrial productor de vacunas al reducir la reactogenicidad y los costos de mantenimiento de un microorganismo de difícil crecimiento.

**Palabras Clave:** *Leptospira interrogans*, cinética, EMJH, *lipL32*, *ompL1*, expresión

## INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana, ocasionada por especies patógenas del genero *Leptospira*, es una zoonosis ampliamente distribuida en el mundo; siendo muy frecuente en áreas rurales y urbanas, en zonas tropicales, subtropicales y en regiones templadas (Vanasco *et al.*, 2000; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2008a; Evangelista *et al.*, 2011; Sykes *et al.*, 2011). En la mayoría de países en desarrollo, medio millón de casos son reportados anualmente con una tasa de mortalidad que está entre 3 y 50% (McBride *et al.*, 2005); las epidemias más recientes han sido reportadas en Nicaragua, Sri Lanka y Filipinas (Agampodi *et al.*, 2009; Koizumi *et al.*, 2009; McCurry, 2009). Esta enfermedad afecta a más de 150 especies animales que se convierten en fuente primaria de contaminación para el hombre que generalmente se infecta a través del agua contaminada con orina emitida por animales portadores (Bharti *et al.*, 2003; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2003; Sykes *et al.*, 2010; Villanueva *et al.*, 2010). En animales la enfermedad puede ser asintomática y en humanos puede cursar con diferentes cuadros clínicos que pueden ir desde dolor de cabeza, fiebre, escalofríos, hematuria, hemoglobinuria, meningitis hasta fallas multisistémicas que pueden causar la muerte (Hotez *et al.*, 2006). En especies animales de importancia económica como los bovinos y porcinos provoca fallas reproductivas que afectan la producción pecuaria; sin embargo, en muchos casos los signos clínicos son similares a los causados por otras enfermedades reproductivas (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2001; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2011).

En la actualidad se conocen dos formas de clasificar *Leptospira* spp; la primera por serología y la segunda por genotipificación. La clasificación serológica identifica cepas patógenas *L. interrogans* y cepas saprófitas *L. biflexa*, aisladas del ambiente (Plank *et al.*, 2000; Levett, 2001). Con la genotipificación ha sido posible establecer que hay al menos 19 especies (13 patógenas con más de 260 serovares y seis saprófitas con más de 60 serovares) (Bharti *et al.*, 2003; Ahmed *et al.*, 2006; Palaniappan *et al.*, 2007); la clasificación por serovar se basa en la expresión de las proteínas de la membrana externa (OMP's); se conocen tres tipos: transmembranales, lipoproteínas y proteínas de membrana periférica (Adler y Moctezuma, 2010). Son pocas las proteínas que se han caracterizado experimentalmente, alrededor de 12 OMP's, entre las que se encuentran la lipoproteína LipL32/Hap1 (Haake *et al.*, 2000), la porina OmpL1 (Haake *et al.*, 1993); LigB; LipL21, LipL31, LipL41, LipL45, LipL46, LruA/LipL71, OmpA y Loa22 (Vieira *et al.*, 2009), siendo LipL32 la lipoproteína y la OmpL1 la porina altamente conservadas en todas las especies patógenas de *Leptospira interrogans* y han sido consideradas candidatos vacunales (Guerreiro *et al.*, 2001; Haake *et al.*, 2004; Hauk *et al.*, 2008). La interacción de estas proteínas con la célula hospedero, es lo que le da el carácter virulento a las cepas, pero esta virulencia se va perdiendo por pases sucesivos que son necesarios para el mantenimiento de las cepas en el cultivo bajo condiciones *in vitro* (Ellinghausen., 1973; Adler *et al.*, 1986; Fajardo *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 2008).

Para el diagnóstico de la enfermedad, se emplean diferentes metodologías, que van desde la observación directa del microorganismo y el cultivo hasta métodos serológicos y moleculares. El diagnóstico directo mediante microscopio de campo oscuro tiene la desventaja de requerir personal con bastante experiencia en la identificación de la bacteria. El test de microaglutinación (MAT) a pesar de ser el método más utilizado y el recomendado por la Organización Mundial de la Salud, es una prueba subjetiva y presenta el riesgo de contaminación por parte del personal que emplea antígenos vivos de los distintos serovares (Herrera *et al.*,



2005; Dassanayake *et al.*, 2009). La prueba de ELISA, que se utiliza para la detección de anticuerpos IgM (Smythe *et al.*, 2002) es menos específica que el MAT porque puede generar reacciones cruzadas. Actualmente, se utiliza el diagnóstico molecular que consiste en la identificación de genes patógenos por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) o qPCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real) esta técnica, tiene la ventaja de determinar la presencia de la bacteria en corto tiempo en diferentes fluidos biológicos, pero presenta la desventaja de ser costosa (Slack *et al.*, 2006; Rahelinirina *et al.*, 2010; Boisier *et al.*, 2011). El cultivo microbiológico es la prueba confirmatoria para *Leptospira* spp (Oliveira *et al.*, 2001); sin embargo, existen inconvenientes para mantener el crecimiento de estos microorganismos debido a que es complicado obtener los aislamientos porque la bacteria tiene un crecimiento lento y el medio de cultivo se contamina fácilmente; esto hace del cultivo un proceso largo y dispendioso (Céspedes *et al.*, 2007; Cameron *et al.*, 2008; Ricaldi *et al.*, 2008; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2008b; Torres *et al.*, 2008; Evangelista *et al.*, 2011; Hartskeerl *et al.*, 2011).

A través de los años, se han realizado estudios en la modificación de los medios de cultivo con el fin de favorecer el crecimiento y el mantenimiento de la bacteria conservando sus características antigénicas y de virulencia; sin embargo el aislamiento y mantenimiento de la bacteria ha sido difícil (Vogel *et al.*, 1961; Baseman *et al.*, 1966; Shenberg, 1967; Henneberry *et al.*, 1970; Staneck *et al.*, 1973; González *et al.*, 2003; González *et al.*, 2005; González *et al.*, 2006). Se han producido diferentes medios de cultivo como Stuart, Fletcher, Korthof y Cox que utilizan suero obtenido de diversas especies animales; otros como el medio de cultivo EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) que sustituye el suero por albúmina sérica bovina y Tween 80 como suplemento. Sin embargo, en diferentes estudios se ha reportado que los requerimientos nutricionales, como ácidos grasos de cadena larga, factores de crecimiento y sales inorgánicas dependen del serovar y de las condiciones para el mantenimiento y la viabilidad de

*Leptospira* spp (Johnson y Gary, 1963; González *et al.*, 2003; González *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2010). Por consiguiente, el propósito de este trabajo fue determinar el efecto del medio EMJH convencional y modificado sobre la cinética de crecimiento y la expresión de genes asociados con patogenicidad para el mantenimiento de las cepas de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae bajo condiciones estáticas y de agitación. Los resultados obtenidos con el trabajo permitieron evidenciar que en el medio modificado se mantiene el crecimiento de las cepas de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae, una aislada de bovino y la otra como control ATCC (23581), lo cual indica, que las cepas presentaron una respuesta adaptativa a los nutrientes suministrados por el suplemento modificado. También se identificaron los genes patógenos *lipL32* y *ompL1* en las cepas de *Leptospira* spp, cultivadas en el medio modificado y bajo las condiciones realizadas en el estudio, estableciendo que en los puntos seleccionados de la cinética de crecimiento se mantiene la expresión de los genes. Estos resultados servirán de base para seguir evaluando el crecimiento, mantenimiento y la expresión génica de otros serovares de *Leptospira* spp, de importancia en Salud Pública a nivel Nacional e Internacional mediante la utilización del medio de cultivo modificado. Adicionalmente, será posible realizar variaciones en la concentración de ácidos grasos de cadena larga para optimizar el medio y favorecer el crecimiento bacteriano. De esta forma, se beneficia a la industria de productores biológicos para el desarrollo de vacunas y a los laboratorios de diagnóstico al reducir los costos para el mantenimiento del microorganismo en condiciones *in vitro*, pues se puede ofrecer en un futuro un suplemento óptimo y económico que estaría reemplazando el suplemento convencional (suero o albúmina sérica bovina), cuya obtención es costosa, por un subproducto industrial que es el suplemento que se utiliza en el medio modificado.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana causada por un grupo patógeno de *Leptospira* spp, que afecta al hombre como a numerosas especies animales, silvestres y domésticos de importancia económica, particularmente bovinos y porcinos (Brihuega, 2006; Balen *et al.*, 2009). Es considerada una enfermedad endémica en muchos países, por ser de tipo estacional y zoonótica, puede presentarse en cualquier época del año e incrementarse por los cambios climáticos, inundaciones y altas poblaciones de hospederos de mantenimiento (Vadillo, 2002). A nivel mundial, anualmente se han reportado medio millón de casos en Asia, Oceanía, EE.UU, Filipinas; Indonesia, Francia, República Checa; India, el Caribe y América Latina (Masuzawa *et al.*, 2006; Thaipadungpanit *et al.*, 2007; Cerquiera y Picardeau, 2009; Slack *et al.*, 2009; McCurry, 2009). En Colombia de acuerdo con el Instituto Nacional de Salud (INS) para el año 2009 los casos registrados por esta enfermedad fueron 876 (32 fallecidos), en el año 2010 se reportaron 1.271 personas afectadas (26 fallecidas) y en el año 2011 llegaron a 2.442 casos con leptospirosis en el país; las regiones más afectadas fueron los departamentos de Guaviare, Guainía, Sucre, Risaralda y la ciudad de Santa Marta (INS, 2011).

El agente etiológico que causa la leptospirosis es la *Leptospira* spp. Esta espiroqueta patógena infecta aproximadamente a más de 150 especies animales, que se constituyen en reservorios y portadores (Sykes *et al.*, 2010). En el sector pecuario la leptospirosis puede provocar pérdidas de animales (infección accidental) o problemas reproductivos (infección de mantenimiento), que afectan la morbimortalidad de los animales afectando la producción, aumentando los

costos por tratamientos y elevando el riesgo de contaminación para otras especies animales y para las personas que están en contacto con ellas (Corbeil, 2001).

En el ser humano la infección ocurre de manera accidental, debido a la exposición con aguas o suelos contaminados con orina de animales infectados y por la inadecuada disposición de residuos (Tucunduva *et al.*, 2007; Villanueva *et al.*, 2011). Se conoce poco de la enfermedad y es de difícil diagnóstico por lo inespecífico de los síntomas que pueden ser similares a los de otras infecciones de tipo febril, viral y hemorrágico, confundiendo con cuadros clínicos como el dengue (OMS, 2010). El diagnóstico de laboratorio también ha reportado dificultades debido a la no existencia de una prueba eficaz, precisa y rápida. La técnica de referencia empleada a nivel mundial y recomendada por la Organización Mundial de la Salud para confirmar los casos de leptospirosis, es el MAT (Test de aglutinación microscópica) pero esta tiene la desventaja de presentar una baja sensibilidad y especificidad; además de no contar con criterios unificados en cuanto a títulos considerados como positivos lo que hace que la técnica sea bastante subjetiva (Barrochi *et al.*, 2001; Kantilaras *et al.*, 2002; Natarajaseenivasan *et al.*, 2005; Instituto Nacional de Salud, 2006). La forma ideal de realizar el diagnóstico definitivo es mediante el aislamiento de la espiroqueta en medios de cultivos (Palmer y Zochowski, 2000; Ministerio de Salud y Desarrollo Social (MSDS), 2003; Oficina Internacional de Epizootias (OIE, 2008); sin embargo, este es un método que puede tardar semanas o meses debido a que se ha reportado la dificultad de obtener un crecimiento rápido y viable de la bacteria (OIE, 2008; Evangelista y Coburn, 2011). En este sentido, es necesario establecer las necesidades nutricionales de la bacteria porque no todos los serovares crecen bajo las mismas condiciones; por lo tanto, es determinante para su crecimiento la utilización de medios de cultivo químicamente definidos que aporten sales de amonio como fuente de nitrógeno, ácidos grasos, como fuente de carbono y energía, y sales minerales que faciliten la ionización en el medio para la regulación del pH, la presión osmótica y las reacciones bioquímicas (Levett, 2001; Murray,

2009; Adler, 2010). Actualmente el medio de cultivo EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) suplementado con albúmina sérica bovina (BSA) es el más utilizado pero el alto costo del suplemento incrementa significativamente los costos de mantenimiento especialmente en la producción de vacunas e investigaciones de rutina (González *et al.*, 2002; Sykes *et al.*, 2011). En el laboratorio los costos se incrementan debido a que el crecimiento de la bacteria es lento y el tiempo de generación varía dependiendo de la cepa y de la calidad del medio de cultivo (Louvel *et al.*, 2006); además, el mantenimiento de la bacteria requiere de pases seriados incluyendo varias réplicas por cepa, porque la bacteria tiende a aglutinarse tras varios días de incubación (Levett, 2003; Bharti *et al.*, 2003). La obtención periódica de estos subcultivos representa un riesgo de contaminación cruzada y pérdida de la viabilidad y estabilidad genética de las cepas originando un inconveniente importante en la utilización y mantenimiento de la *Leptospira* spp. Además, se ha demostrado que algunos factores de virulencia de *Leptospira* spp, son reguladas, después de varios pases en el medio de cultivo (Levett, 2001; Palaniappan *et al.*, 2002; Bomfim *et al.*, 2007; Atzingen *et al.*, 2008; OIE, 2008; Vieira, 2009). Un método para el mantenimiento de las cepas es la criopreservación, esta permite detener las reacciones metabólicas durante períodos prolongados, hasta 7 meses en conservación a -70°C y hasta 19 meses a -190°C en nitrógeno líquido, conservando la estabilidad genética; sin embargo, la mayoría de células bacterianas criopreservadas se dañan durante las etapas de congelación y descongelación, también la citotoxicidad de los criopreservantes causan letalidad sobre los microorganismos (Reed *et al.*, 2000; Borrero *et al.*, 2010). Diversos estudios han evidenciado que al mejorar las condiciones del medio de cultivo se facilita el crecimiento y el mantenimiento de las cepas con características de patogenicidad y virulencia estables al menos en 8 subcultivos sucesivos (Baseman y Cox, 1969; Staneck *et al.*, 1973; González *et al.*, 2002). Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo principal de este trabajo fue determinar el efecto del medio de cultivo EMJH convencional y modificado sobre la cinética de crecimiento y la expresión de genes asociados con patogenicidad para el

mantenimiento de las cepas de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae, en condiciones de crecimiento estático y de agitación.

Con los resultados de este proyecto se logró mantener la viabilidad de las cepas en un medio modificado, donde se utilizó como suplemento un subproducto industrial (sujeto a patente); además, se generó un aporte en la cinética de crecimiento y en la expresión de los genes *lipL32* y *ompL1* de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. De esta forma, se propicia un beneficio a la comunidad científica porque este es el primer reporte que evidencia el mantenimiento de cepas de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae en un medio modificado; así como, el establecimiento de la cinética de crecimiento y los estudios moleculares de genes asociados con patogenicidad en estas cepas. Este trabajo proyecta la realización de futuras investigaciones utilizando el medio modificado para determinar el crecimiento de otros serovares de *Leptospira* spp, como también, continuar investigando sobre la optimización del medio y la identificación molecular de otros genes asociados con cepas patógenas de *Leptospira* spp.

Este estudio aporta en la reducción de costos para el mantenimiento de la bacteria debido a que el componente más costoso, que se utiliza en el medio de cultivo convencional, es un suplemento comercial que contiene suero o albúmina sérica bovina y en el medio modificado se reemplazó este suplemento convencional por un subproducto industrial. De esta forma, con la modificación del medio de cultivo, se pueden reducir los costos de mantenimiento bacteriano, proceso necesario para el estudio de la bacteria y para la producción de grandes volúmenes de cultivo requeridos en la producción de vacunas contra leptospirosis; en este sentido, se beneficia el sector industrial, los laboratorios y las empresas productoras de biológicos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del medio de cultivo EMJH convencional y modificado sobre la cinética de crecimiento y la expresión de genes asociados con patogenicidad para el mantenimiento de las cepas de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar físico-química y microbiológicamente los suplementos convencional y modificado bajo los parámetros establecidos por la normatividad colombiana para que se evidencie el efecto del mantenimiento de las cepas en estudio.
2. Establecer las cinéticas de crecimiento de cepas de *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae en los medios de cultivo EMJH convencional y modificado en condiciones estáticas y de agitación para ser utilizadas como indicativo de la viabilidad de las cepas en los medios de cultivo.
3. Determinar la expresión de los genes *lipL32* y *ompL1* en las cepas de *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae en diferentes tiempos del crecimiento bacteriano para la verificación de los genes asociados con patogenicidad en los medios de cultivo y bajo las condiciones establecidas en el trabajo.

### 3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

#### 3.1. GENERALIDADES E IMPORTANCIA DE LA LEPTOSPIROSIS

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa, zoonótica y de distribución mundial que afecta a los animales y a los humanos (Hartmann y Greene, 2007). En Colombia, esta enfermedad se ha diagnosticado desde del año 1976 en diferentes especies animales (Griffiths *et al.*, 1982). La Figura 1 muestra la prevalencia de serovares de *Leptospira* spp reportados para bovinos en la región Andina; adicionalmente, se determinó que la enfermedad incide negativamente en la reproducción y en la producción animal, lo cual ocasiona altos costos económicos. La prevalencia general en Colombia para bovinos es de 62% para el serovar Icterohaemorrhagiae, 12.8% para Hardjo, 23% para Grippotyphosa, 15,4 para Australis y 10.8% para Pyrogenes (Macías, *et al.*, 2005). En los bovinos la enfermedad se caracteriza por presencia de ictericia, abortos y caída brusca en la producción de la leche (Bolin, 2001; Givens, 2006; Givens y Marley, 2008).

El agente causal de la leptospirosis pertenece al genero *Leptospira* y se clasifica en especies saprófitas como *Leptospira biflexa*, presentes en el medio ambiente, y especies patógenas como *L. interrogans* que provoca la enfermedad en los animales y en el hombre. Estudios realizados por Adler y Moctezuma, 2010 clasificaron las leptospiras genéticamente e indicaron que hay al menos 19 especies (13 patógenas y 6 saprófitas). Siete de estas especies: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilli*, *L. kirschneri* y *L. alexanderi* son los principales agentes patógenos de la leptospirosis (Admed, *et al.*, 2006). Por consiguiente, todas las especies reconocidas de leptospiras patógenas se han



clasificado en 25 serogrupos y 260 serovares (Palaniappan, *et al.*, 2007; OMS, 2008).

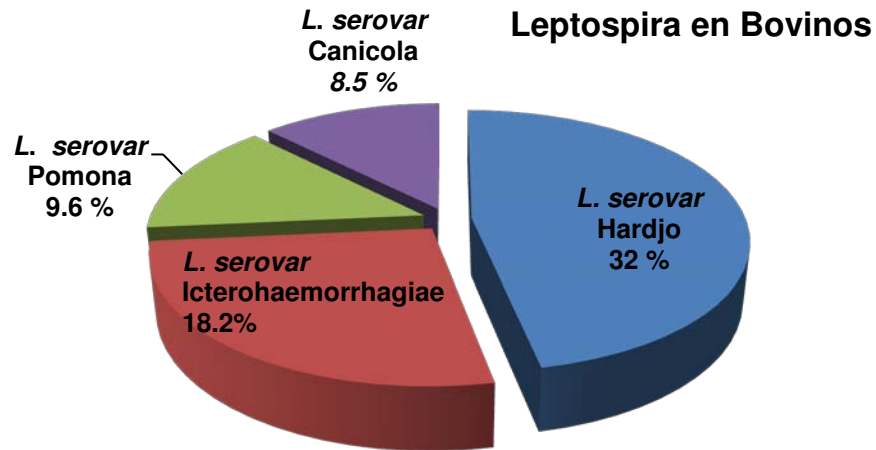


Figura 1. Leptospiras aisladas de Bovinos. Serovares predominantes en la región Andina Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona y Canicola. (Fuente: Gallego *et al.*, 1994).

Las leptospiras se encuentran en diversos ambientes y requieren de un alto grado de humedad, sobreviven en suelos o en el agua cuando el pH es neutro o ligeramente alcalino, pueden resistir temperaturas entre 7 y 36°C. En el laboratorio las leptospiras saprófitas pueden ser un contaminante durante la preparación de los medios de cultivo; especialmente cuando las muestras de fluidos biológicos no son obtenidas asépticamente (OMS, 2008). Las leptospiras patógenas están en los túbulos renales de algunos animales que actúan como reservorios y diseminadores de las bacterias, contaminando el ambiente, el agua o los alimentos; por lo tanto, juegan un papel importante epidemiológicamente siendo difícil el control de la contaminación entre los animales y el hombre (Hartskeerl *et al.*, 2000; Harkin *et al.*, 2003; Brihuega, 2008; Evangelista y Coburn, 2011). A nivel mundial se han presentado brotes y epidemias de leptospirosis, siendo endémica en la China, Cuba, Tailandia, India y en los países tropicales en donde anualmente se reporta un considerable número de casos y fallecidos (Rodríguez *et al.*, 2000). En Centro y Sur América las epidemias se han incrementado después de los desastres naturales (Zaki *et al.*, 1996; Trevejo *et al.*, 1998). Esta situación ha

despertado un interés internacional hacia la leptospirosis, determinándose desde el año 1995 como una enfermedad infecciosa emergente (INH, 2000).

La leptospirosis fue descrita en 1886 por Adolf Weil y se le conoce como Síndrome de Weil, o síndrome icterico con falla renal (Vieira *et al.*, 2009). Estudios realizados para la identificación de la enfermedad, concluyeron que se debe realizar un diagnóstico diferencial debido a que el cuadro clínico de la patología se confunde con síntomas de enfermedades muy parecidas como el dengue, influenza, hepatitis viral, brucelosis, borreliosis, mononucleosis, malaria, fiebre tifoidea, fiebre amarilla, rickettsiosis, fiebre hemorrágica venezolana, pielonefritis e intoxicaciones (Levett, 2001; WHO-OPS y INH, 2001).

### **3.2. CARACTERÍSTICAS DE LEPTOSPIRA**

Las leptospiras son espiroquetas aerobias obligadas, pertenecientes a la familia *Leptospiraceae*, orden Spirochaetales (Veloso *et al.*, 2000). Son bacterias Gram negativas, con crecimiento óptimo a temperatura entre 28 y 30°C (Palmer y Zochowski, 2000), tienen un coeficiente de refracción como el cristal, por eso no se ven en microscopios de luz pero se pueden observar bajo la óptica de campo oscuro (Mandell *et al.*, 2000; Acha y Szyfres, 2001; Sánchez *et al.*, 2007). La Figura 2 muestra que las leptospiras tienen forma de hélice o espiral, son muy delgadas, flexibles y móviles, presentan dos filamentos axiales (flagelos periplásmicos) insertados en ambos extremos de la bacteria (Blaha, 1995); su movimiento es giratorio rotacional (*Leptospirosis*, 2006), su longitud está entre 6 y 20 µm y su diámetro es de 0,1 µm.

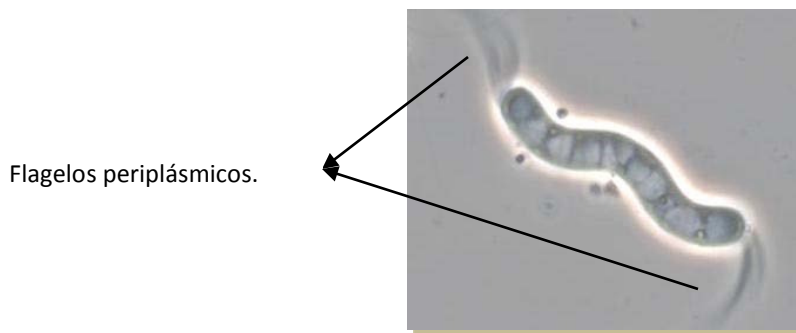


Figura 2. *Leptospira interrogans* con flagelos periplásmicos. Fuente: Green-Mckenzie, 2011.

Estas bacterias son resistentes al frío y se destruyen a temperaturas de 50-55 °C, son sensibles a la desecación, los rayos solares y mueren rápidamente en medios con pH ácido. Si las condiciones ambientales son favorables pueden sobrevivir hasta 180 días (Ginebra, 2001). Diversos estudios han demostrado que las leptospiras no se diferencian en cuanto a su morfología macroscópica y su bioquímica; siendo indistinguibles entre serovares (Ellis *et al.*, 1983). Las *Leptospiras* tienen una estructura celular parecida a las bacterias Gram negativas, con una membrana citoplasmática estrechamente relacionada con la capa de peptidoglicano; además, presentan una membrana externa que contiene lipoproteínas, proteínas periféricas o externas y proteínas transmembranales. Estas proteínas son de importancia en la adhesión del microorganismo a los tejidos del hospedero, ocasionando la lesión y por lo tanto desencadenando la enfermedad (Haake, 2000).

### **3.3. REQUERIMIENTO NUTRICIONAL PARA EL CULTIVO *in vitro* DE *Leptospira spp***

Las leptospiras son quimioorganotrofos y requieren de ácidos grasos de cadenas de más de 15 carbonos presentes en el suero de diferentes especies animales o la fracción V de albúmina sérica bovina; pueden crecer en medios de cultivo líquido o semisólido. Algunos autores, como Vervoort (1922), Wolff (1924), utilizaron medios

de cultivo líquido para el crecimiento de leptospiras patógenas; este medio de cultivo contenía compuestos químicos como cloruro de sodio, cloruro de potasio, dicloruro de calcio, carbonato de sodio y solución buffer de fosfato. En 1932 Korthof, modificó el medio de cultivo adicionándole factores de crecimiento como B<sub>12</sub> y ácido nicotínico y en 1946 Stuart, incorporó al medio de cultivo, asparagina, cloruro de amonio, dicloruro de magnesio, glicerol e indicador de pH, favoreciendo el metabolismo para el crecimiento de estos microorganismos (Babudieri *et al.*, 1961). En 1932 Dinger, modificó el medio de cultivo propuesto por Korthof, adicionándole agar al 3% y manteniendo en el medio de cultivo el suero como fuente de proteína; a este autor, se le atribuye, la evidencia de la formación de un anillo de crecimiento bacteriano en el medio de cultivo, llamado “Zona de Dinger”, que consiste en la observación de una ligera turbidez hacia arriba y abajo del anillo de crecimiento, que se da a partir del séptimo día de incubación; la formación de este anillo se observa en la figura 3.

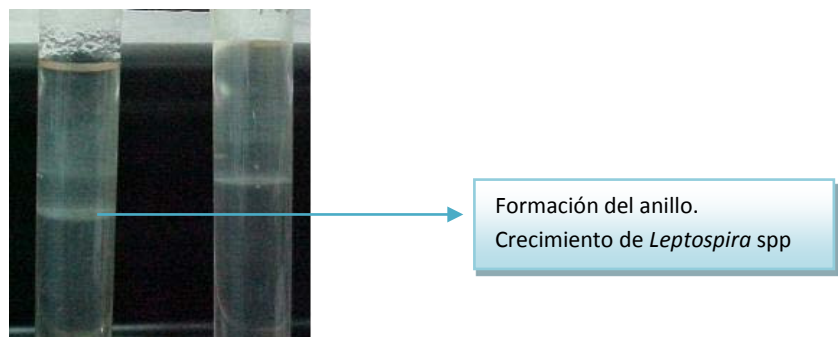


Figura 3. Crecimiento de *Leptospira* spp en medio de cultivo, semisólido EMJH. Fuente: Green-Mckenzie, 2011.

Posteriormente, se reportó que las leptospiras patógenas no requerían de suero de conejo para su crecimiento, siempre y cuando el medio de cultivo tuviera un factor de crecimiento como B<sub>12</sub>, logrando cultivar leptospiras patógenas en un medio de cultivo libre de proteínas (Babudieri y Zardi, 1959); sin embargo, Esther Shenberg, en 1967, logró determinar un medio de cultivo libre de proteínas químicamente definido, cultivando 52 cepas de leptospiras patógenas con óptimos

rendimientos celulares a excepción de los serovares Ballum y Javanica que no crecieron en este medio; así mismo, se determinó que el requerimiento nutricional para alcanzar el máximo rendimiento de las células bacterianas para los serovares Canicola, Pomona y Grippytyphosa consistió en un medio basal que favorecía el crecimiento de estos serovares, compuesto por sales inorgánicas, purinas, pirimidinas, ácidos grasos, vitamina B<sub>12</sub>, tiamina, potasio y los iones de calcio, magnesio, manganeso, zinc, hierro y fósforo (Hutner, *et al.*, 1957; Shenberg., 1967; Russell y Russell., 1978). El medio de cultivo químicamente definido fue el punto de partida para el desarrollo del medio de cultivo libre de proteínas, realizado por Russell *et al.*, 1978, mediante la adición de Tween 80 y la combinación de diferentes concentraciones, Tween 40, 60 y 80; utilizando cinco serovares de *Leptospira* (Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Grippytyphosa y Hardjo); sólo Canicola creció en el medio que contenía Tween 80, lo cual indica la exigencia nutricional de estos serovares de *Leptospira* spp. (Veneseltine y Staples., 1961; Johnson y Gary., 1963; Russell *et al.*, 1978).

Estudios posteriores, como el propuesto por Ellinghausen, McCullough y Johnson en 1965, desarrollaron un medio de cultivo basal sintético, le adicionaron albúmina sérica bovina, Tween 80, cloruro de amonio, tiamina y buffer de fosfatos, manteniendo la viabilidad y virulencia de cepas de *L. Pomona* y *Grippytyphosa* en condiciones *in vitro* en el laboratorio (Ellinghausen., 1973). Así, en 1969 fue reportado por Ellinghausen y McCullough que los iones de amonio suministran la fuente de nitrógeno, para sintetizar enzimas, proteínas y ácidos nucleicos, que estimulan el crecimiento de las leptospiras en un medio de cultivo complejo que contenía albúmina y ácido oleico. Sin embargo, el Tween 80 aporta a los medios de cultivo la fuente necesaria de carbono y de energía para el desarrollo de la bacteria. Las leptospiras obtienen su energía de la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga y no pueden utilizar aminoácidos o carbohidratos como fuentes energéticas importantes y el piruvato, aunque no es un nutriente esencial, aumenta la iniciación del crecimiento de leptospiras saprófitas como patógenas

(Johnson *et al.*, 1973; Staneck *et al.*, 1973). A partir de esta última formulación, el medio de cultivo EMJH se ha utilizado en investigación, modificando el medio basal, mediante la adición de acetato de sodio y extracto de carne, obteniendo un rendimiento de biomasa tres veces mayor y el mantenimiento de la expresión de los principales antígenos inmunorrelevantes de *L. Ballum* (González *et al.*, 2002; González *et al.*, 2003; González *et al.*, 2005; González *et al.*, 2006). De esta manera, se corrobora que por la gran variedad de serovares de *Leptospira* es necesario caracterizar diferentes cepas y así lograr la adaptación del microorganismo al medio de cultivo y tener buenos rendimientos celulares dependiendo del serovar. Esto confirma las exigencias nutricionales de la *Leptospira*, en los medios de cultivo y la variación en rendimiento según la cepa. Para el crecimiento la bacteria también necesita oligoelementos como el hierro y el zinc, considerados nutrientes importantes; sin embargo, altas concentraciones de estos metales ocasionan toxicidad para las células bacterianas (Louvel *et al.*, 2006).

### **3.3.1 COMPONENTES QUÍMICOS SUPLEMENTO CONVENCIONAL**

El suplemento comercial contiene albúmina sérica bovina (BSA) y Tween 80, éste último proporciona al medio de cultivo ácidos grasos de cadena larga que son las principales fuentes de carbono y energía para las leptospiras (Johnson y Gary, 1963; Veneseltine y Staples, 1961). El Tween 80 recibe el nombre de Polioxietilinosorbitanmonooleatano o Polisorbato 80, químicamente está compuesto de 22.5% de ácidos grasos con aproximadamente 3% de ácidos libres en forma no esterificada (Davis, 1947). Estos ácidos grasos libres resultan de la hidrólisis espontánea de los enlaces esterés del Tween 80, son tóxicos para las leptospiras a concentraciones relativamente bajas (Shenberg, 1966). El Tween 80, es un surfactante no iónico, compuesto de sustancias superficialmente activas que modifican la interfase de los sistemas; su principal característica es que posee un grupo polar y otro apolar y es muy utilizado en la industria farmacéutica. La

albúmina sérica bovina, en mayores cantidades con respecto al Tween 80, permite el crecimiento de las células bacterianas, porque actúa como destoxicante y estabilizador, y se une con los ácidos grasos libres en el medio de cultivo proporcionando un sustrato no tóxico para las leptospiras (Ellinghausen y McCullough, 1965), debido a que elimina la toxicidad de los ácidos grasos libres (Figura 4).

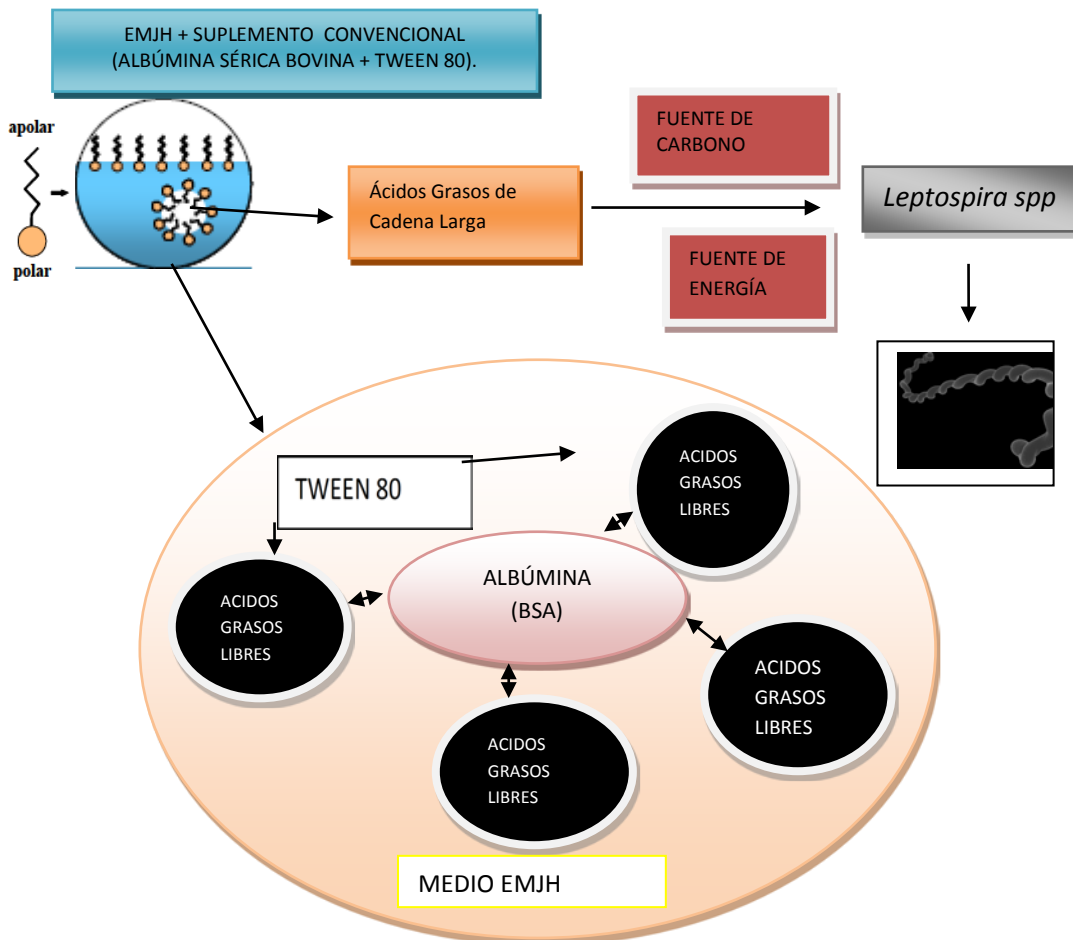


Figura 4. Suplemento convencional en el medio EMJH. El Tween 80, tiene un grupo polar y el otro apolar, aportando al medio de cultivo la fuente de carbono y de energía; mientras que la albúmina neutraliza los ácidos grasos libres que son tóxicos para *Leptospira spp.*

### 3.3.2. COMPONENTES QUÍMICOS SUPLEMENTO MODIFICADO

El suplemento modificado está compuesto por polisorbato 80 (Tween 80) y por proteínas solubles, lípidos; azúcares reductores; humedad 1 a 8%; cenizas 7 a 14%, ácidos carboxílicos hasta el 4% (Ghasemi *et al.*, 2009), y sales minerales (8-10% de extracto seco) (Muñí *et al.*, 2005; Londoño, 2006; Panesar *et al.*, 2007). Los minerales son potasio, calcio, fósforo, sodio y magnesio, cuenta también con vitaminas como tiamina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico, cobalamina y ácido ascórbico (Londoño *et al.*, 2008). Además, contiene albúmina que es estable en un amplio rango de temperatura hasta 70°C y presenta gran solubilidad (Chan *et al.*, 1995). Las investigaciones realizadas por Cohn *et al.*, en 1946, sirvieron de base para el fraccionamiento del plasma obtenido de albúmina bovina en muchos países (Wadsworth, 1947; Putnam, 1960). La albúmina bovina ha tenido gran importancia en la investigación científica y en la aplicación en diversas áreas, especialmente en estudios inmunológicos e inmunohematológicos; fue descubierta por Diamond y Denton en 1945 por su capacidad para promover aglutinación específica de eritrocitos humanos por anticuerpos (IgG). Se han realizado diferentes métodos para la producción de albúmina a partir de plasma bovino, entre ellos, la precipitación con sulfato de amonio (Putnam, 1960; Kabat, 1968) y por fraccionamiento etanólico por el método de Hao (Hao, 1979), obteniéndose un porcentaje de pureza del 98% por este último método.

Las albúminas y las globulinas presentan una fuerte afinidad por el agua, son proteínas termosensibles y se desnaturalizan por el calor a temperaturas superiores de 70°C. La alfa-lactoalbúmina representa el 23% de las proteínas y contiene ácido glutámico y leucina. La albúmina sérica, es exactamente igual que la albúmina del suero sanguíneo, es especialmente rica en lisina y cistina, contiene ácido aspártico y alanina; es muy soluble en agua y se puede cristalizar a partir de una solución concentrada de sulfato de amonio. Además, se encuentran las lactoglobulinas que se caracterizan por tener elevado peso molecular, son



menos solubles al agua y se precipitan en una solución semisaturada de sulfato de amonio. También, se encuentran las inmunoglobulinas, las cuales se pueden inactivar por calentamiento a 70 °C durante 30 minutos (Amiot, 1991).

### 3.3.3. RELACIÓN DE COSTOS PARA EL MANTENIMIENTO DE *Leptospira* spp *in vitro*.

La tabla 1 muestra la relación de costos rutinarios, en el laboratorio de la Universidad de La Salle, para el mantenimiento anual de 10 cepas de *Leptospira* spp con el suplemento convencional y modificado. Teniendo en cuenta que para el suplemento convencional se necesita la utilización de suero de conejo y/o albúmina sérica bovina, los cuales incrementan los costos de mantenimiento, bien sea por los elevados costos del suplemento convencional o por la obtención del suero que requiere el mantenimiento de animales, como también la utilización de métodos físicos como la temperatura y químicos como el fraccionamiento alcohólico o la precipitación de sulfato de amonio con el fin de inactivarlo y garantizar un mayor porcentaje de pureza. Por el contrario, el suplemento modificado al ser un subproducto industrial de desecho puede reducir los costos en un 50 % aproximadamente frente al suplemento convencional.

Tabla 1. Relación de los costos de rutina para el mantenimiento de *Leptospira* spp en el laboratorio.

Producto	Costo anual del medio de cultivo EMJH*	
	Convencional	Modificado
Medio EMJH basal	\$ 192.000	\$ 192.000
Agar- Agar	\$ 259.200	\$ 259.200
Suplemento	\$ 39.960.000	\$ 0
5' Fluorouracilo	\$ 3.096.000	\$ 3.096.000
Buffer fosfatos	\$ 38.400.000	\$ 38.400.000
<b>Total</b>	<b>\$ 81.907.200</b>	<b>\$ 41.947.200</b>

\*Datos calculados para el mantenimiento de 10 cepas en un año.

### **3.4. CINETICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.**

El crecimiento bacteriano es el aumento del número de microorganismos a través del tiempo, como consecuencia se origina una población o cultivo. El tiempo que se requiere para la detección de un cultivo positivo para el crecimiento de leptospiras varía con el serovar y el número de células viables presentes en la muestra.

Diferentes estudios han mostrado que los serovares menos exigentes como Pomona y Grippotyphosa pueden dar resultados positivos entre 7-10 días después de la inoculación; otros serovares como Hardjo y Bratislava pueden tardar más tiempo. Sin embargo, durante el ciclo celular se encuentra en un estado de crecimiento equilibrado en donde la duplicación de la biomasa es igual a la duplicación de ADN, ARN y proteínas. Matemáticamente se ha establecido el crecimiento bacteriano en donde la velocidad de aumento de bacterias en un tiempo determinado es directamente proporcional al número o masa de bacterias presentes en ese tiempo. Esto es:

$\mu$  (masa de células) = Velocidad de aumento celular.

En donde  $\mu$  = constante de velocidad de crecimiento.

Pero también:

$\mu N = dN / dt$ ; donde:  $N$  = Número de células x mL

$\mu X = dX / dt$ ; donde:  $X$  = Masa Celular x mL

$\mu Z = dZ / dt$ ; donde:  $Z$  = Cantidad de cualquier componente celular x mL.

*El valor de  $\mu$  es suficiente para definir la velocidad de crecimiento de un cultivo.*

#### **3.4.1. FASES DE LA CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO**

El crecimiento bacteriano comprende un período previo al crecimiento activo denominado fase de latencia, esta fase se puede reducir usando inóculos

relativamente grandes que corresponden de un 3 a un 10% de un cultivo en fase exponencial, deben ser metabólicamente activos y estar libres de contaminantes; por lo general, los cultivos se inician con inóculos correspondientes a una concentración celular de  $1.5 \times 10^8$  cel/mL del tubo 5 de la escala de McFarland (NTC 2455) o dependiendo de las necesidades y condiciones abióticas de los microorganismos. Cuando transcurre el tiempo el número de células viables por unidad de volumen en el cultivo disminuye; así como los nutrientes, aumenta la competencia por el oxígeno, la producción de sustancias tóxicas y la aparición de mutantes (Jawetz, *et al.*, 1996). La Figura 5 representa una curva de crecimiento en donde se establecen cada una de las fases del crecimiento bacteriano.

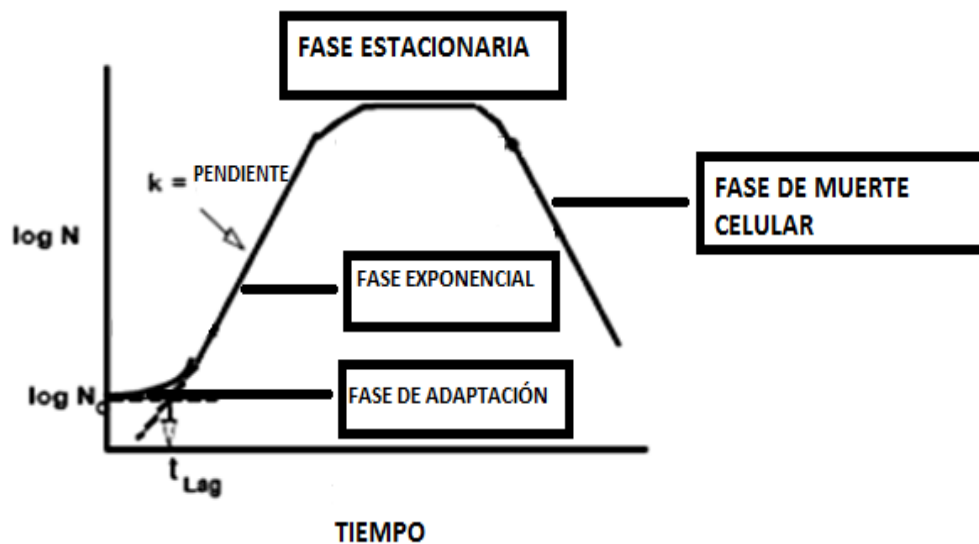


Figura 5. Representación gráfica del crecimiento y curva de crecimiento bacteriano. Fuente: Labuza T, 2004.

La fase de latencia se caracteriza porque los microorganismos se adaptan a su nuevo ambiente, se forman enzimas y metabolitos intermediarios que se acumulan hasta alcanzar las concentraciones que permitan reiniciar el crecimiento (Brooks *et al.*, 2005); por lo tanto, la velocidad de crecimiento es igual a cero ( $\mu=0$ ). La segunda fase es la de aceleración positiva, las células disminuyen en tamaño,

utilizan las reservas y la velocidad de crecimiento inicia su fase exponencial ( $\mu$ = Creciente) (Brooks *et al.*, 2005). La tercera fase es la exponencial o de crecimiento logarítmico, las células crecen a una velocidad máxima constante; en esta fase, se sintetiza nuevo material celular y está en proceso de catálisis que conlleva al aumento en forma exponencial de la masa bacteriana. Hay un equilibrio de flujo de material y este proceso se mantiene hasta que se agoten los nutrientes (Oxígeno en los aerobios) y se acumulen muchas sustancias tóxicas que inhiben el crecimiento. Estos eventos ocurren cuando la concentración bacteriana alcanza de 4 a 5 x10<sup>9</sup> cel/mL donde la velocidad de difusión del oxígeno no puede satisfacer las necesidades de crecimiento bacteriano y por lo tanto el crecimiento disminuye progresivamente (Brooks *et al.*, 2005). La cuarta fase es la de desaceleración, durante esta fase las células viven del metabolismo endógeno; por lo tanto, disminuye la velocidad de crecimiento ( $\mu$ = Decreciente) (Brooks *et al.*, 2005). La quinta fase es la estacionaria donde se produce el agotamiento de los nutrientes, se incrementa la acumulación de productos tóxicos y cesa el crecimiento bacteriano. Sin embargo, en la mayoría de los casos hay recambio celular; es decir, hay una pérdida lenta de células por muerte lo cual es compensado por la formación de nuevas células. Cuando esto se presenta el número total de células aumenta lentamente aunque la cuenta de células viables permanece constante (Brooks *et al.*, 2005) y la velocidad de crecimiento es cero ( $\mu$ =0). La última fase es la de declive o muerte celular, la velocidad de mortalidad aumenta hasta alcanzar un nivel estable. Después de que la mayoría de células han muerto, la velocidad de mortalidad disminuye ( $\mu$ =Negativa), de tal manera que un pequeño número de células pueden persistir en el cultivo por meses o por años. En algunos casos puede indicar recambio celular, creciendo unas cuantas células a expensas de los nutrientes liberados por las células que mueren y se lisan (Brooks *et al.*, 2005).

### 3.4.2. PARÁMETROS CINÉTICOS DE CRECIMIENTO

Los parámetros de crecimiento microbiano están bajo tres aspectos importantes:

1. El crecimiento total de la población bacteriana que se debe al incremento en el número de células o de masa microbiana, 2. La velocidad de crecimiento, que es el cambio en el número de células o masa celular en función del tiempo, 3. La determinación del tiempo de duplicación o tiempo de generación, que es el tiempo requerido para la división y depende del metabolismo de los microorganismos.

Los diferentes parámetros cinéticos de crecimiento se calculan mediante distintas ecuaciones, es importante determinar el tiempo de generación de una población bacteriana durante el crecimiento exponencial; estos análisis, se pueden calcular matemáticamente mediante una progresión geométrica donde se relaciona directamente el número de células iniciales y el número de células obtenidas al final de la fase exponencial. Por consiguiente, el crecimiento bacteriano se comporta de acuerdo con la siguiente relación:

$$N = 2^n \quad (\text{Ecc.1})$$

Determinándose como  $N$ , el número de células y  $n$  como el número de generaciones. Se puede deducir que, Si  $N = N_f$  en determinado tiempo  $N_{f(t)}$ , entonces  $N_{f(t)}$  es dependiente del número inicial de células ( $N_o$ ) y del número de divisiones que haya tenido en ese intervalo de tiempo  $n_{(t)}$ , se integra la ecuación 2 con la ecuación 1 y se obtiene la expresión matemática que rige el crecimiento bacteriano:

$$N_f = N_o * 2^n \quad (\text{Ecc.2})$$

Esta expresión matemática se define, como  $N_f$  = número final de células,  $N_o$  = número inicial de células y  $n$  = número de generaciones durante el período de la fase exponencial. A su vez, se puede calcular el número de generaciones a partir

de la ecuación 2, cuando se incorpora el logaritmo en ambos lados de la ecuación, así, n se expresa matemáticamente como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{LogNf} = \text{logNo} + n \cdot \text{log}2$$

$$\text{LogNf} - \text{logNo} = n \cdot \text{log}2$$

$$\text{LogNf} - \text{logNo} / \text{log}2 = n$$

**Entonces:**  $n = 3,3 \cdot \text{LogNf} - \text{logNo}$  ó  $n = \text{logNf} - \text{logNo} / 0.301$

De esta manera se calcula el número de generaciones, con el fin de determinar el tiempo de generación (Tg) o el tiempo de duplicación (Td), cuya expresión es  $t/n$ , donde t son los días, horas o minutos de crecimiento exponencial, y se obtiene, realizando la diferencia de tiempo, entre el tiempo de inicial de crecimiento y el tiempo final de crecimiento en la fase exponencial. Por lo tanto, el tiempo de generación o de duplicación, se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Td} = t/n \quad \text{ó} \quad \text{Tg} = t / 3,3 \cdot (\text{logNf} - \text{logNo})$$

Por último para la determinación de la Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), y la Constante de velocidad relativa de crecimiento (K), se debe tener en cuenta que la variable  $x(t)$ , es dependiente del tiempo, ya que describe la variación de la concentración celular, por lo tanto, la velocidad instantánea del proceso es la derivada de  $x(t)$ :  $dx(t)/dt$ . Es decir, que la Velocidad específica de crecimiento se puede expresar de la siguiente forma:

$$\mu(t) = dx/dt$$

En un cultivo bacteriano la velocidad de crecimiento es la medida del aumento absoluto en la concentración celular por unidad de tiempo. Se concluye que la velocidad específica de crecimiento es el incremento en la concentración celular por unidad de tiempo por célula. Por lo tanto, si  $x(t)$  es positivo se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$\mu(t) = d(\ln x(t))/dt$$

Por lo tanto, la velocidad de crecimiento específica puede medirse como la inclinación de la curva de crecimiento, cuando el logaritmo natural ( $\ln$ ) de  $x(t)$  se traza con el tiempo. Si el  $\log_{10}$  es usado en lugar de  $\ln$ , entonces la pendiente de  $\log_{10}$  será moderada = 2.3 veces menor que la velocidad de crecimiento específico cuando se emplea el  $\ln$ ; la velocidad de crecimiento se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$\mu = \ln N_f - \ln N_o / (T_f - T_o)$$

De donde,  $N_f$  = es el número final de células,  $N_o$  = es el número inicial de células,  $T_f$  = es el tiempo final del crecimiento en la fase exponencial y  $T_o$  = es el tiempo inicial de la fase exponencial. Sin embargo, cuando se tiene la velocidad específica de crecimiento, se puede calcular la constante de velocidad relativa de crecimiento, porque se multiplica la constante 2.303 por la velocidad específica de crecimiento. Esto se demuestra mediante la siguiente ecuación.

$$K = 2.303 * (\log N_f - \log N_o / T_f - T_o) \text{ o } K = 2.303 * \mu$$

### 3.5. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DIRECTO, SEROLÓGICO Y MOLECULAR.

Existen diferentes métodos de diagnóstico para la identificación de *Leptospira* spp, estos se basan en la observación directa de los diferentes fluidos biológicos mediante la utilización de microscopios de campo oscuro y de fluorescencia y a través de coloraciones de impregnación Argéntica en estudios histopatológicos. La Tabla 2 describe las técnicas utilizadas para la observación e identificación directa de *Leptospira* spp.

Tabla 2. Métodos de Identificación directa de *Leptospira* spp.

<b>TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO - EXÁMEN DIRECTO.</b>	<b>REFERENCIA</b>
Microscopio de campo oscuro: Baja sensibilidad y especificidad.	OMS, 2008
Microscopio de campo claro: Coloración de rojo Congo e impregnación Argéntica. Utilizado en estudios histopatológicos.	INS, 2006
Microscopio de fluorescencia: Utilizado con mayor frecuencia en veterinaria.	Levett, 2001

Los métodos directos para detectar las leptospiras incluyen los cultivos, pero el lento crecimiento de la bacteria, no contribuye a un diagnóstico rápido en la fase temprana de la enfermedad. Además, de los exámenes directos de diagnóstico, se realiza el diagnóstico de leptospirosis por métodos serológicos, mediante pruebas Inmunoenzimáticas (ELISA), esta técnica detecta anticuerpos clase IgM en la fase temprana de la enfermedad, sólo utiliza un antígeno, llamado antígeno género específico y tiene la desventaja que no indica el serovar infectante o serogrupo causante de la enfermedad. También, se utilizan otros métodos como los inmunohistoquímicas y están la inmunofluorescencia y la inmunoperoxidasa, estos métodos son útiles en el diagnóstico postmortem y en tejidos fijados, tiene la desventaja de presentar errores como dar falsos negativos o falsos positivos, por



la escasa presencia de leptospiras en los tejidos (Alves *et al.*, 1989; Vip, 1992). Dentro de las pruebas de aglutinación microscópicas, la más utilizada es el test de microaglutinación (MAT). Esta prueba determina los antígenos aglutinantes en suero y es considerada como la técnica de referencia recomendada por la Organización Mundial de la Salud, pero es una técnica bastante subjetiva debido a que los resultados pueden variar de una persona a otra (Hartskeerl *et al.*, 2000). Las pruebas de biología molecular incluyen la hibridación in situ para detectar DNA de leptospiras (Levett, 2001). La técnica más utilizada para el diagnóstico de *Leptospira* es la prueba de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), tiene una alta sensibilidad y especificidad (Brown *et al.*, 1995; Ko *et al.*, 2009; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2011), tiene la ventaja de identificar los genes patógenos de *Leptospira* spp en la fase temprana de la enfermedad y no emplear serovares vivos como los que utiliza la prueba de MAT, garantizando la bioseguridad en el laboratorio y disminuyendo el riesgo de contaminación. Actualmente, se está utilizando la técnica de PCR en tiempo real, es el método de elección para el análisis de la expresión génica y se basa en el principio físico de la fluorescencia, ha sido validada por la OIE (2004). Para la interpretación de los datos requiere de genes normalizadores o constitutivos, llamados housekeeping que se utilizan como genes de referencia o controles internos. Estos controles internos, deben mostrar mínimos cambios, mientras que los genes de interés podrían cambiar con el curso del experimento (Bustin *et al.*, 2005; Dheda *et al.*, 2005; Huggett *et al.*, 2005); por lo tanto, las condiciones experimentales no deben alterar la expresión del gen housekeeping (Schmittgen, 2000; Sturzenbaum y Kille, 2001). Además, se han realizado varias pruebas mediante la técnica en tiempo real para la detección de *Leptospiras* spp (Smythe *et al.*, 2002; Palaniappan *et al.*, 2005; Merien *et al.*, 2005; Levett *et al.*, 2005) y se utiliza como herramienta en investigación de diagnóstico rápido en leptospirosis aguda (Levett *et al.*, 2005).

### 3.6. ASPECTOS MOLECULARES

Las cepas patógenas de *Leptospira* presentan una membrana celular externa constituida por fosfolípidos, proteínas de membrana externa (OMP) y lipopolisacáridos (LPS) (Mandell *et al.*, 2000). La membrana externa de las espiroquetas sirve como barrera selectiva que excluye algunas moléculas y permite la entrada de nutrientes constituyéndose en la interfaz entre la célula y su ambiente externo. Las proteínas de membrana se distribuyen en todos los compartimentos de la célula bacteriana y se considera están involucradas en la interacción bacteria–hospedero durante la infección, ocasionando la enfermedad (Vieira *et al.*, 2008). Actualmente, las proteínas de membrana externa han despertado el interés de muchos investigadores debido a su importancia antigénica. Se encuentran varias porinas de leptospiros patógenas que sirven como adhesinas y facilitan la absorción intracelular de las bacterias (Rude *et al.*, 1996). Las porinas, son proteínas transmembranales que están divididas en dos clases, las que presentan un solo canal de conductancia, como es el caso de TROMP1, OmPL1, y Oms28 y las que presentan un largo canal de conductancia, como el observado con Oms66 y Msp (Cullen *et al.*, 2009). En cuanto a las lipoproteínas se encuentra la LipL32, que es la principal proteína de membrana externa de las leptospiros patógenas; representa un 75% del componente proteico total (Cullen *et al.*, 2002 y 2005). Esta proteína es inmunogénica y se expresa tanto en la infección aguda como en la crónica; sin embargo, algunos estudios han corroborado que la mayoría de las personas con leptospirosis tienen una respuesta alta de anticuerpos a LipL32 (Haake *et al.*, 2000; Flannery *et al.*, 2001; Guerreiro *et al.*, 2001; Nally *et al.*, 2007). Otras lipoproteínas presentes en la membrana externa son la LipL41 (Shang *et al.*, 1996; Haake *et al.*, 2004), LipL36 (Haake *et al.*, 1998), LipL21 (Cullen *et al.*, 2003), LipL46 (Matsunaga *et al.*, 2006; Verma *et al.*, 2006) y OmpA-proteínas Loa22 (Koizumi y Watanabe, 2003). En la Figura 6 se puede observar cómo están distribuidas algunas de las OMP; además,

se explica la conformación de la pared celular de bacterias Gram negativas, como *Leptospira* spp.

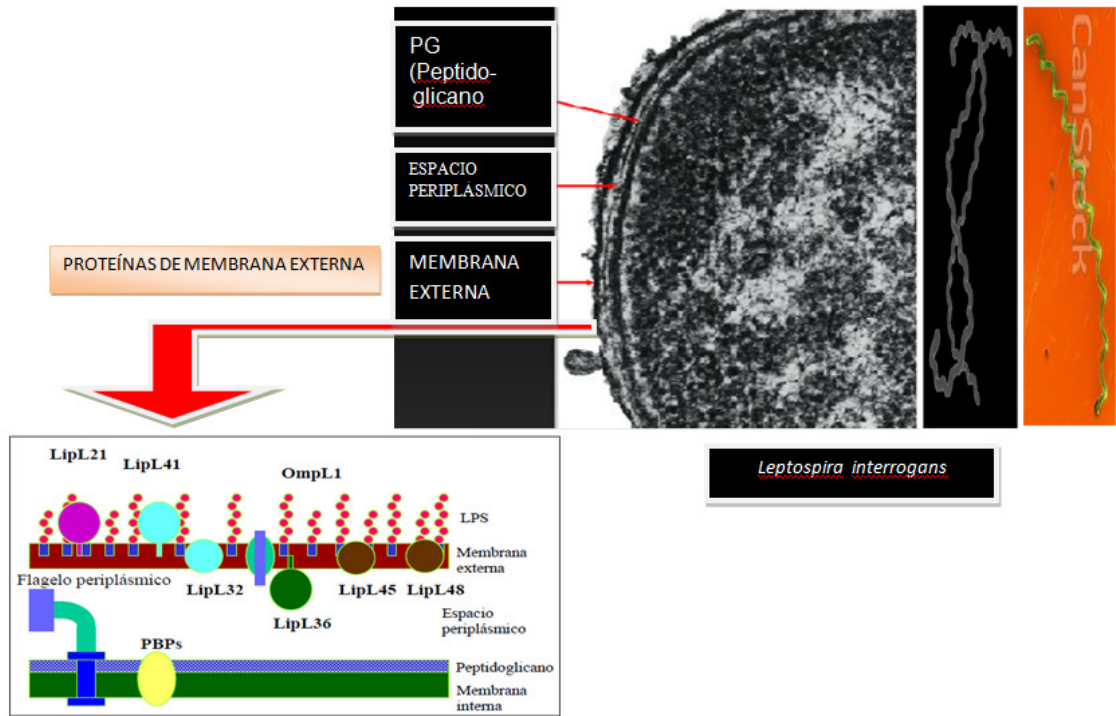


Figura 6. Pared celular de bacterias Gram negativas y las proteínas de membrana externa (OMP) de *Leptospira interrogans* Adaptado de Jiménez, 2006.

Se han realizado estudios en la variación de la secuencia de los genes que codifican la superficie de las proteínas de membrana externa de las leptospiras patógenas y se ha comprobado que la secuencia de los genes que codifican LipL32, que es la principal proteína de membrana externa, fueron altamente conservados con respecto a la variación de los genes que codifican la OmpL1, dando como resultado que LipL32 es altamente inmunogénica (McBride *et al.*, 2009). Se ha demostrado que los cambios en la expresión génica de algunas proteínas fueron inducidos por el aumento de la temperatura y la osmolaridad durante la infección en las células hospedero; de esta manera, las proteínas Lig (Inmunoglobulinas leptospirales, LigA y LigB), cuya expresión génica está controlada por las condiciones ambientales y la regulación de las lipoproteínas con

respecto a la osmolaridad son requeridos por el microorganismo para adaptarse a los entornos cambiantes (Haake *et al.*, 2004; Lin y Chang, 2007). No obstante, Lig A es una proteína altamente inmunogénica y se expresa *in vivo* en la infección por *Leptospira* spp en equinos (Palaniappan, 2002); además, este grupo de proteínas Lig, ha sido utilizadas como marcadores para el diagnóstico temprano de la enfermedad y como candidatos para el desarrollo de vacunas contra la leptospirosis al igual que LipL32 y OmpL1 (Zhang, 2005; Yan *et al.*, 2009; Baquero *et al.*, 2010).

## **4. METODOLOGÍA**

### **4.1. OBTENCIÓN DEL SUPLEMENTO MODIFICADO Y CONVENCIONAL**

Para la selección del suplemento modificado se tuvo en cuenta que la composición química fuera similar al suplemento convencional; adicionalmente, que fuese un producto de desecho (sujeto a patente) de un proceso industrial de los desarrollados en la Facultad de Ingeniería de Alimentos de la Universidad de La Salle, lo cual garantiza que sea económico y aprovechable para la investigación. Paralelamente, se utilizó el suplemento convencional (Difco ®) y se determinó el pH de los dos suplementos.

### **4.2. EVALUACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DEL SUPLEMENTO CONVENCIONAL Y MODIFICADO.**

Se evaluó físico-química y microbiológicamente el suplemento comercial y modificado en los laboratorios de Química y de Microbiología del Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad de La Salle- Sede Norte.

#### **4.2.1. Evaluación físico-química**

El porcentaje de proteínas se determinó mediante el método de Biuret utilizando un espectrofotómetro Génesis® a una longitud de onda de 540 nm (Anexo 1). Las proteínas totales y los compuestos nitrogenados se determinaron a través del método volumétrico (Kjeldahl) bajo la norma AOAC 991.20, utilizando el equipo de

Kjeldahl® en tres pasos. 1. Digestión de la muestra. 2. Destilación con arrastre de vapor del amoníaco. 3. Valoración ácido base del amoníaco producido (Anexo 2). El porcentaje de los azúcares totales y reductores se establecieron por el método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) según el protocolo presente en el Anexo 3. La determinación del porcentaje de humedad y de cenizas se realizó según el protocolo establecido en el Anexo 4 y se determinó de acuerdo a la norma NTC 5476 y la determinación del porcentaje de grasa se realizó según el método de Gerber (Método Butirométrico) (Anexo 5) establecido por la norma ISO 2446.

#### **4.2.2. Evaluación microbiológica del suplemento convencional y modificado**

Para la evaluación microbiológica del suplemento modificado y comercial se realizaron diluciones seriadas, desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ , en agua peptonada al 0.1%, (Anexo 6). Para establecer el recuento total de microorganismos mesófilos y el recuento de hongos y levaduras en UFC/mL se utilizó la técnica de profundidad y se siguió el protocolo establecido en el Anexo 7. Para determinar el número más probable (NMP) para coliformes totales y fecales, el recuento de *Estafilococos* coagulasa positivo (UFC/mL) y la presencia o ausencia de *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes* se llevó a cabo el procedimiento descrito en el Anexo 8 bajo las normas NTC 4458, NTC 4779, NTC 4574 y NTC 4225 respectivamente.

### **4.3. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae EN MEDIO DE CULTIVO EMJH CONVENCIONAL Y MODIFICADO BAJO CONDICIONES DE CRECIMIENTO ESTÁTICO Y DE AGITACIÓN.**

#### **4.3.1. Activación de cepas y cultivo estático**

Durante este estudio se utilizó la cepa control ATCC (23581) y la cepa *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae aislada de una muestra de Bovino que

fue donada al Grupo BIOMIGEN de la Universidad de La Salle por el Laboratorio Nacional de Referencia Animal del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA-CEISA). Las cepas se activaron en medio de cultivo EMJH líquido hasta alcanzar una concentración de  $15 \times 10^8$  células/mL (patrón de McFarland 5) (NTC 2455, 2000).

Para cultivar las bacterias activadas se utilizó el medio de cultivo EMJH convencional y EMJH modificado al que se le adicionó el antibiótico 5-fluorouracilo para evitar la contaminación (Johnson, 1964) (Anexo 9). Se realizó control de esterilidad de los cultivos a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas y luego se inocularon los medios de cultivo, con 1 mL de la suspensión de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae tanto de la cepa aislada de bovino como de la cepa control ATCC (23581), en 99 mL del medio de cultivo EMJH convencional y en 99 mL del medio de cultivo EMJH modificado, se homogenizaron los medios con el vortex y se tomaron 5 mL de cada homogenizado y se distribuyeron en 35 tubos tapa rosca por triplicado, cada tubo se rotuló desde  $t_0$  hasta  $t_{35}$  y 5 tubos fueron tomados como control; para un total por cada homogenizado de 110 tubos que fueron incubados a  $29 \pm 1^\circ\text{C}$  por 35 días en condiciones estáticas. Los tubos se codificaron internamente con el fin de facilitar el manejo posterior de los datos (Tabla 3). La curva de crecimiento fue determinada por espectrofotometría (Génesis®  $\lambda = 400 \text{ nm}$ ) a través de la concentración microbiana de cada cultivo por triplicado cada 24 horas, partiendo en el tiempo de inicio ( $t_0$ ) de la investigación y durante los 35 días de incubación en condición estática.

Tabla 3. Codificación de las muestras para manejo de los datos.

CODIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN
Lic.	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Icterohaemorrhagiae
1	Cepa aislada ( <i>Leptospira interrogans</i> serovar Icterohaemorrhagiae)
2	Cepa control ( <i>Leptospira interrogans</i> serovar Icterohaemorrhagiae)
A	Medio de cultivo EMJH convencional
B	Medio de cultivo EMJH modificado
AC	Medio de cultivo EMJH convencional en agitación
BC	Medio de cultivo EMJH modificado en agitación

En cada cultivo se evaluó la motilidad y la uniformidad celular por observación directa con un microscopio de campo oscuro (Olympus CH - 30), después, se verificó la pureza mediante coloración de Gram (Merck, 1994); además de lo anterior, se tomó 1 mL de cada uno de los tubos y se depositó en criotubos de capacidad de 2mL para ser almacenados a -70°C; con el fin de crioconservar las muestras para ser utilizadas en las pruebas moleculares. Posteriormente, se calcularon los parámetros del crecimiento microbiano como la velocidad específica de crecimiento, el tiempo de duplicación y el número de generaciones (Brooks *et al.*, 2005).

#### 4.3.2. Cultivo agitado

Se tomó 1mL de cada cultivo y se inocularon asépticamente en 99 mL de cada medio de cultivo EMJH convencional y modificado, en condiciones de agitación. Los cultivos se iniciaron con la concentración del día 8 de la fase exponencial del cultivo estático de las cepas *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae, determinado en un estudio previo realizado por Rodríguez y Pulido (2010). Posteriormente, se homogenizaron con vortex y fueron distribuidos 50 mL de cada homogenizado en 12 erlenmeyers por triplicado, se rotularon con el nombre de la cepa (aislada y control ATCC) y el medio de cultivo correspondiente (convencional y modificado). Luego, se llevaron a un Shaker con temperatura y agitación constante (T= 29°C +/- 1° y 130 rpm) durante 10 días. La curva de crecimiento fue



determinada por espectrofotometría (Génesis®  $\lambda = 400 \text{ nm}$ ) a través de la concentración microbiana de cada cultivo por triplicado cada 24 horas, partiendo en el tiempo de inicio ( $t_0$ ) de la investigación y durante 10 días de incubación en condición de agitación. Se observó al microscopio de campo oscuro evaluando características como motilidad y uniformidad celular; además se realizaron controles de pureza a los cultivos por medio de tinción de Gram. Finalmente, se tomó 1 mL de cada muestra, se depositó cada muestra en criotubos y se llevaron a crioconservar a  $-70^\circ\text{C}$ , con el fin de ser utilizadas en la determinación molecular. Posteriormente, se calcularon los parámetros del crecimiento microbiano como la velocidad específica de crecimiento, el tiempo de duplicación y el número de generaciones (Brooks *et al.*, 2005).

#### **4.4. ESTUDIO MOLECULAR**

##### **4.4.1. Identificación de los genes *ompL1* y *lipL32***

Para la extracción del RNA bacteriano se utilizó el kit de extracción ZR Fungal/Bacterial RNA MicroPrep (ZymoResearch®), la extracción se realizó a partir de 1 mL de cultivo líquido de la bacteria, previamente almacenado de forma rápida a  $-70^\circ\text{C}$ , teniendo en cuenta tres puntos de la curva de crecimiento bacteriano; durante la fase de adaptación, la fase exponencial y la fase de declive; además, para determinar la mejor forma de extraer y mantener el RNA total, se realizó un estudio piloto que permitió identificar el protocolo más adecuado de mantenimiento y calidad del RNA bacteriano (Anexo 10).

##### **4.4.2. Retrotranscripción o generación de DNA complementario**

Una vez se realizó la extracción del RNA bacteriano (según el protocolo descrito a partir de 1 mL de cultivo de los puntos de crecimiento previamente seleccionados),

las muestras fueron sometidas a RTPCR y electroforesis con el fin de corroborar la obtención de RNA. La síntesis de cDNA se realizó a partir de 1 µg de RNA con el kit comercial Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche®), según las instrucciones de la casa comercial en un volumen total de 30 µL. Las reacciones de RT fueron almacenadas en el termociclador MasterCycler de Eppendorf® bajo las siguientes condiciones: 37°C por 45 minutos, 42°C por 15 minutos y se finalizó con una temperatura de 92°C por 2 minutos. Posteriormente, el cDNA obtenido fue almacenado a -20°C y se utilizó para la realización de la PCR.

#### **4.4.3 PCR Convencional y PCR en tiempo real**

Para la PCR se utilizaron 2 pmol/µL de primers forward y reverse específicos para los genes *lipL32* y *ompL1*, 1.25 U *Taq* polimerasa, 30 µM Tris-HCl, 1.5 µM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 10 µL agua libre de nucleasas y 2 µL de las muestras de cDNA para un volumen final de reacción de 48 µL. Se utilizó un termociclador MasterCycler de Eppendorf® con las siguientes condiciones: 95°C por 5 minutos y 45 ciclos de 94°C por 15 segundos, 56°C por 35 segundos, 72°C por 40 segundos y 72°C por 10 minutos. Como control positivo se utilizó una cepa de *Leptospira interrogans* (ATCC 23581). Para el gen *rrl* también se utilizaron las condiciones descritas en un estudio previo (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2011) en las que se emplearon 2 pmol/µL de primers forward y reverse, 1.0 U *Taq* polimerasa, 30 µM Tris-HCl, 1.5 µM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 10 µL agua libre de nucleasas y 2 µL de las muestras de DNA para un volumen final de reacción de 48 µL. Para la amplificación se empleó el mismo equipo con las siguientes condiciones: 95°C por 5 minutos y 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 1 minuto y 72°C por 2 minutos y la extensión final a 72°C por 10 minutos. Posteriormente se realizó electroforesis de los productos amplificados los cuales se sembraron en geles de agarosa al 2 y 2.5% teñidos con bromuro de etidio para su visualización en un transiluminador®.

#### 4.5. Modelo Estadístico.

La tabulación, la base de datos y el procesamiento de los mismos se realizó mediante el programa SPSS. Además, se realizó el control de sesgos descrito en la tabla 4:

**Tabla 4:** Control de sesgos

<b>ETAPA</b>	<b>SESGO</b>	<b>CONTROL</b>
<b>Medio de Cultivo</b>	Variación en los componentes	Cambio de una sola variable (suplemento).
<b>Medición de crecimiento y patogenicidad.</b>	Diferencias en las mediciones	Realización por triplicado de cada medición
<b>Extracción del RNA total</b>	Cambios en el protocolo.	Se llevaron a cabo las indicaciones del productor del kit y el procedimiento fue realizado por la misma persona.
<b>Retrotranscripción y obtención del DNA complementario</b>	Cambios en el protocolo.	Se llevaron a cabo las indicaciones del productor del kit y el procedimiento fue realizado por la misma persona.
<b>Amplificación DNA Complementario PCR Convencional</b>	Productos amplificados inespecíficos, contaminación.	Inclusión de controles negativos y positivos lo cual garantizó especificidad en la obtención de las bandas de amplificación.
<b>PCR tiempo real y expresión génica</b>	Interacción inespecífica, unión a dímeros  Falsos Negativos	Discriminación de productos inespecíficos con “curva de desnaturalización” (Melt-Curve).  Control de inhibición  Estándares internos (genes de referencia, control interno, control de carga, triplicados)

La tabla 5 se establece el plan de análisis para el cumplimiento de las variables.

**Tabla 5:** Plan de Análisis General

Condición	Variable Mayor	Variable Menor	Unidad de Medida
<b>Cultivo Estático</b>	<b>Medio EMJH Convencional</b>	<b>Crecimiento</b>	Sin crecimiento Con crecimiento
		<b>Patogenicidad</b>	Negativa Positiva
	<b>Medio EMJH Modificado</b>	<b>Crecimiento</b>	Sin crecimiento Con crecimiento
		<b>Patogenicidad</b>	Negativa Positiva
<b>Cultivo en agitación</b>	<b>Medio EMJH Convencional</b>	<b>Crecimiento</b>	Sin crecimiento Con crecimiento
		<b>Patogenicidad</b>	Negativa Positiva
	<b>Medio EMJH Modificado</b>	<b>Crecimiento</b>	Sin crecimiento Con crecimiento
		<b>Patogenicidad</b>	Negativa Positiva

A partir del plan de análisis se utilizó el programa spss para determinar las medidas de tendencia central en cada uno de los grupos de datos. Para determinar la existencia de variación entre cada uno de los medios de cultivo y condiciones del cultivo planteadas en el trabajo se realizó el test de Shapiro-Wilk para determinar normalidad y la prueba de Levene para homocedasticidad. Una vez realizados estos procedimientos se definió la realización de la Prueba ANOVA o el test de Welch dependiendo del cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad. En todos los casos se hallaron los valores de significancia, con un nivel de confianza del 95%.

## **5. RESULTADOS**

Los resultados obtenidos en el trabajo se presentan en tres etapas que comprenden la evaluación físico-química y microbiológica del suplemento convencional y modificado, bajo la normatividad técnica colombiana (NTC); la determinación de la cinética de crecimiento de las cepas aislada y control ATCC de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae, en los medios de cultivo EMJH convencional y modificado, bajo condiciones estáticas y de agitación, la realización del estudio molecular para la identificación de los genes *lipL32* y *ompL1* por PCR convencional y la expresión por PCR en Tiempo Real (qPCR).

### **5.1 EVALUACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DEL SUPLEMENTO CONVENCIONAL Y MODIFICADO**

#### **5.1.1. Obtención de los suplementos**

El suplemento modificado es un residuo líquido, subproducto de desecho (sujeto a patente) de un proceso industrial. Este subproducto, presenta diferentes clases de proteínas como  $\beta$ -lactoglobulinas,  $\alpha$ -lactoalbúmina, inmunoglobulinas, albúmina sérica bovina, glicomacropéptidos y lactoferrina; estas proteínas, aportan al medio de cultivo basal, excelente fuente de aminoácidos esenciales, contiene elevados niveles de triptófano y aminoácidos de cadena ramificada y cantidades trazas de aminoácidos aromáticos, como también regulan la absorción y la biodisponibilidad de hierro (Aider *et al.*, 2009). El Anexo 11 muestra los componentes del

suplemento convencional (Difco®). El pH para el medio modificado fue de 7.0 y para el suplemento convencional fue de 7.2

### 5.1.2. Evaluación físico-química del suplemento convencional y modificado

Los resultados para la determinación de las concentraciones de los porcentajes por Biuret, Kjeldahl, azúcares totales y reductores de los dos suplementos, se obtuvieron a partir de las curvas de calibración con un coeficiente de correlación del 0.99% lo que garantiza la confiabilidad de los resultados. Por lo tanto, los resultados del porcentaje de proteína por Biuret correspondieron al 0.85% +/- 0.03 para el suplemento modificado y el 9.30% +/- 0.30 para el suplemento convencional (Anexo 1); por Kjeldahl se encontró que el suplemento convencional presentó un 8.96% +/- 0.03 de proteína frente a un 0.82% +/- 0.03 de proteína en el suplemento modificado, los cálculos se muestran en el Anexo 2. Los resultados para la determinación de porcentaje de azúcares totales y reductores correspondieron al 3.60% +/- 0.03 para el suplemento modificado y del 0.48% +/- 0.01 para el suplemento convencional y para reductores fue de 1.72 % +/- 0.01 para el suplemento modificado y 0.11% +/- 0.01 suplemento convencional Anexo 3. El porcentaje de humedad, cenizas y grasas para el suplemento modificado y convencional se presentan en la Tabla 6 y los cálculos para la obtención de los porcentajes se presentan en los Anexos 4 y 5. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar todas las determinaciones químicas entre el suplemento convencional frente al modificado  $p < 0.05$  (Anexo 6).

Tabla 6. Resultados de pruebas del porcentaje de humedad, cenizas y grasas del suplemento modificado y convencional.

PRUEBAS	SUPLEMENTO MODIFICADO	SUPLEMENTO CONVENCIONAL
Porcentaje de Humedad	94.3% +/- 0.1	89.1% +/- 0.1
Porcentaje de Cenizas	0.37% +/- 0.02	0.17% +/- 0.02
Porcentaje de Grasa (Gerber)	0.6%	< 0.1%

### **5.1.3. Evaluación microbiológica de los suplementos**

Los resultados obtenidos en las diferentes pruebas microbiológicas demostraron que en el suplemento convencional y modificado no se desarrollaron colonias en las cajas de dilución inicial, ni en las otras diluciones hasta  $10^{-6}$ ; por lo tanto, el número de U.F.C/mL de la muestra es  $<10$ . Los resultados para el crecimiento de *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes* fueron negativos reportándose como ausentes en ambas muestras. Los Anexos 6 a 8 muestran los resultados de los cultivos.

### **5.2. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae EN MEDIO DE CULTIVO EMJH CONVENCIONAL Y MODIFICADO BAJO CONDICIONES DE CRECIMIENTO ESTÁTICO Y DE AGITACIÓN.**

En el medio de cultivo modificado, bajo condiciones estáticas, se logró el crecimiento de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae; sin embargo, al final de la fase exponencial e inicio de la fase estacionaria de crecimiento las dos cepas, aislada de bovino y control ATCC (23581), presentaron un menor rendimiento en el medio EMJH modificado frente al convencional, (Figura 7). La velocidad específica fue menor en el medio EMJH modificado y el tiempo generacional fue superior a los alcanzados por las dos cepas en el medio EMJH convencional (Tabla 7). Los resultados de las curvas de crecimiento y los cálculos para los parámetros cinéticos se relacionan en los Anexos 13 a 16. Se encontró que existen diferencias significativas  $p < 0.05$  entre el crecimiento (cel/mL) obtenido por las cepas *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae en el medio convencional frente al modificado en condiciones estáticas (Anexo 17).

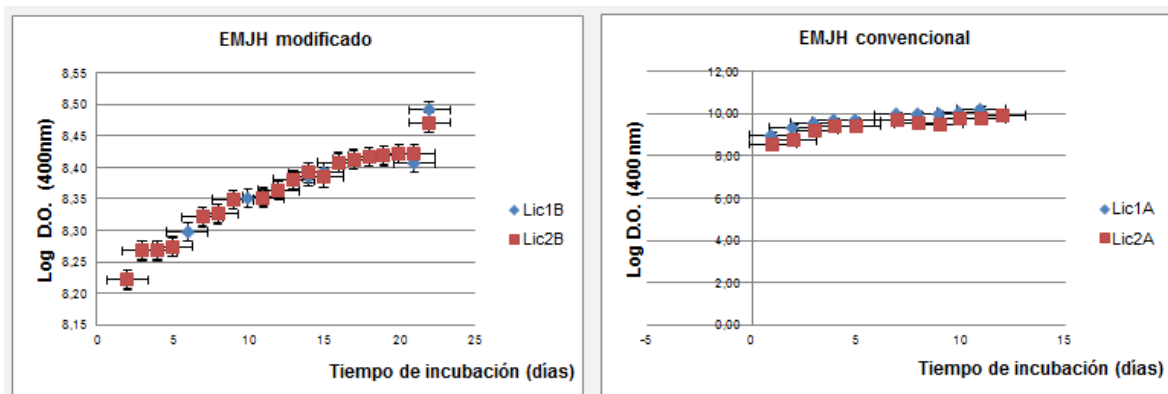


Figura 7. Crecimiento exponencial de las cepas *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae (Lic1= cepa aislada, Lic2= cepa control ATCC) en el medio EMJH modificado y convencional con condiciones estáticas (29+/-0.1 °C).

Tabla 7. Parámetros de crecimiento evaluados en las cepas *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae durante el cultivo estático.

Medio	<i>Leptospira interrogans</i>	Concentración Celular (cel/mL) Fase Exponencial		Día final crecimiento exponencial	Velocidad específica de crecimiento $\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Tiempo de Duplicación Td (h)	No. de Generación n (cel/mL)
		Inicial	Final				
Modificado	Aislada	$15 \times 10^8$	$3.10 \times 10^8 \pm 0.01$	22	$1.3 \times 10^{-3}$	538.77	$0.89 \times 10^6$
	Control	$15 \times 10^8$	$2.96 \times 10^8 \pm 0.03$	22	$1.2 \times 10^{-3}$	582.28	$0.82 \times 10^6$
Convencional	Aislada	$15 \times 10^8$	$1.72 \times 10^{10} \pm 0.04$	11	$1.2 \times 10^{-2}$	59.89	$4.00 \times 10^4$
	Control	$15 \times 10^8$	$8.44 \times 10^9 \pm 0.02$	12	$7.6 \times 10^{-3}$	91.58	$2.35 \times 10^7$

Los resultados observados bajo la condición de cultivo agitado de las dos cepas en los medios EMJH modificado y convencional mostraron buen rendimiento celular en ambos medios de cultivo Figura 8. Bajo estas mismas condiciones, las dos cepas mostraron una velocidad específica de crecimiento mayor y un tiempo generacional menor en el cultivo convencional frente al modificado, ver Tabla 8. Los resultados de las curvas de crecimiento y los cálculos para los parámetros cinéticos se relacionan en los Anexos 18 a 21. En condiciones de agitación se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en el medio modificado frente al convencional tanto en la cepa aislada como control ATCC (Anexo 22).



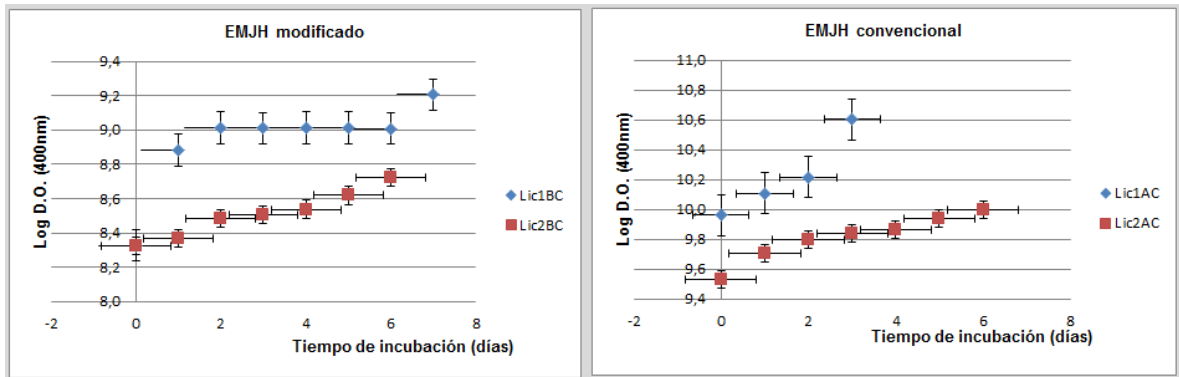


Figura 8. Crecimiento exponencial de las cepas *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae (Lic1= cepa aislada, Lic2= cepa control ATCC) en el medio EMJH modificado y convencional con condiciones de agitación (29±0.1 °C y 130 rpm).

Tabla 8. Parámetros de crecimiento evaluados en las cepas *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae durante el cultivo agitado.

Medio	<i>Leptospira interrogans</i>	Concentración Celular (cel/mL) Fase Exponencial		Día final crecimiento exponencial	Velocidad específica de crecimiento $\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Tiempo de Duplicación Td (h)	No. de Generación n (cel/mL)
		Inicial	Final				
Modificado	Aislada	$2.12 \times 10^8$	$1.61 \times 10^9 \pm 0.03$	7	$4.5 \times 10^{-3}$	57.83	$2.90 \times 10^7$
	Control	$2.12 \times 10^8$	$5.27 \times 10^8 \pm 0.05$	6	$6.80 \times 10^{-3}$	102.60	$1.17 \times 10^5$
Convencional	Aislada	$9.15 \times 10^9$	$3.99 \times 10^{10} \pm 0.01$	3	$2.0 \times 10^{-2}$	34.08	$2.11 \times 10^6$
	Control	$3.39 \times 10^9$	$1.35 \times 10^{10} \pm 0.03$	6	$7.5 \times 10^{-2}$	72.64	$1.55 \times 10^7$

En la Figura 9 se observa *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae en los medios de cultivo EMJH convencional y modificado. En el estudio los tubos utilizados como controles para el medio de cultivo convencional y modificado no presentaron cambios físicos como el color y turbidez; lo cual indica que no se presentó contaminación durante los 35 días de crecimiento en condiciones estáticas y los 10 días en agitación.

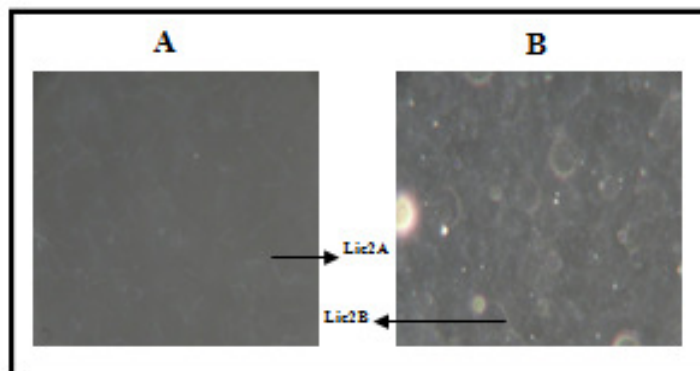


Figura 9. Observación del crecimiento de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae, en microscopio de campo oscuro (40X). A. Cepa control en medio de cultivo convencional (Lic2A). B. Cepa control en medio de cultivo modificado (Lic2B).

Para las fases del crecimiento bacteriano de las cepas en los dos medios de cultivo en condiciones estáticas y de agitación, se observa que la cepa aislada y control en medio de cultivo convencional y modificado en condición estática presentó una fase lag o de adaptación entre 24 y 72 horas. Para la condición de agitación esta fase no se presentó debido a que se partió de un inóculo en fase exponencial en el día 8 bajo condición estática. La cepa aislada y control en medio de cultivo modificado y en condiciones estáticas fue de 20 días en fase exponencial; mientras que bajo estas mismas condiciones la duración de esta fase en los cultivos agitados fue menor, entre 9 y 10 días. Durante la fase estacionaria, las dos cepas sembradas en los dos medios bajo condiciones estáticas se mantuvieron por más tiempo. Por campo oscuro se observó, aglutinación y células bacterianas largas como hilos durante la fase de declive en el medio convencional y en el modificado bajo las dos condiciones de cultivo.

### 5.2.1. ESTUDIO MOLECULAR

El estudio piloto diseñado para realizar la parte molecular del trabajo permitió la estandarización de un protocolo con el fin de identificar el mantenimiento más adecuado del RNA para mejorar su calidad. Además, se estandarizó el protocolo

para la Retrotranscripción, la PCR convencional y la PCR en Tiempo Real. Los resultados del estudio piloto para el mantenimiento y conservación del RNA permitieron establecer que las muestras una vez obtenidas debían ser almacenadas de forma rápida a  $-70^{\circ}\text{C}$  y realizar la extracción de RNA dos días después del almacenamiento del cultivo. En la Figura 10 se observan los amplificados, donde se resalta la obtención de bandas con los tres protocolos de mantenimiento y conservación de RNA para mejorar la calidad de extracción.

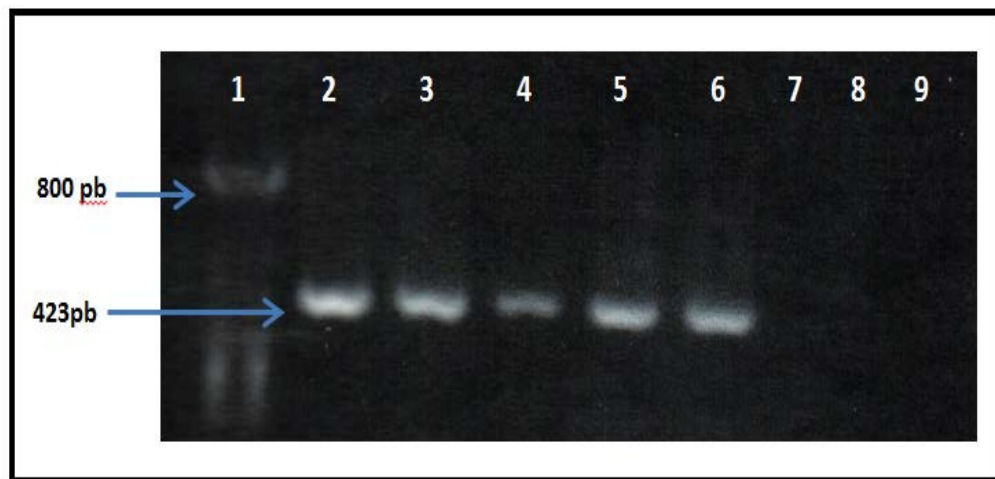


Figura 10. Electroforesis de los productos amplificados del gen *lipL32* (423 pb) en muestras de cultivo de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae sometidas a tres protocolos de mantenimiento y conservación del RNA. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio y visualizado con un transiluminador. Carril 1: Marcador de peso molecular (100-800 pb). Carril 2 y 3: Producto de PCR utilizando el Protocolo 2 (Obtención de muestras, almacenadas de forma rápida a  $-70^{\circ}\text{C}$  para extracción de RNA a los dos días). Carril 4: Productos de PCR utilizando el Protocolo 1 (Obtención de la muestra y extracción inmediata de RNA). Carril 5 y 6: Productos de PCR utilizando el Protocolo 3 (Obtención de muestras, conservadas en glicerol (1:1) y almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , extracción de RNA a los dos días del almacenamiento). Carril 7: Control Negativo (*Salmonella* spp). Carril: 8. Control negativo (RNA Humano). Carril 9: Blanco de Reacción de PCR.

El estudio piloto permitió además, estandarizar la obtención del cDNA y las reacciones de PCR. La Figura11 muestra los productos amplificados de los genes *rrl* (482 pb, *Housekeeping*) que codifica la subunidad ribosomal 23S (León *et al.*, 2006), *lipL32* (423 pb) (Levett *et al.*, 2005) y el gen *ompL1* (960 pb)

(Natarajaseenivasan *et al.*, 2005) de cepas de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae aislada y control ATCC.

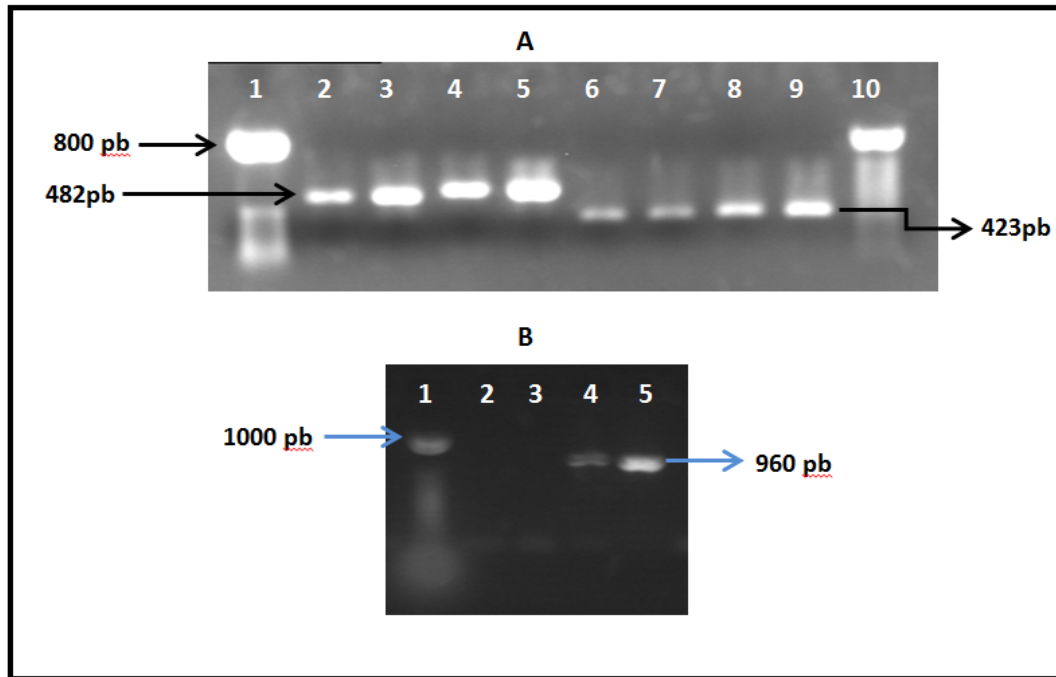


Figura 11. Electroforesis de los productos amplificados de los genes *rrl* (482pb), *lipL32* (423 pb) y *ompL1* (960 pb). A. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2 y 3: Muestras positivas para el gen *rrl* de cultivos de *L interrogans* aisladas. Carril 4 y 5: Muestras positivas para el gen *rrl* de cepas ATCC de *L interrogans* y *L biflexa*. Carril 6 a 8: Muestras positivas para el gen *lipL32*. Carril 9: Muestras positivas para el gen *lipL32* de *L interrogans* cepa ATCC. Carril 10: Marcador de peso molecular. B. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Control negativo (*E coli*). Carril 3: Blanco de reacción de PCR. Carril 4: Muestra positiva para el gen *ompL1* de *L interrogans* aislada. Carril 5: Muestra positiva para el gen *ompL1* de *L interrogans* ATCC (control positivo). Estos productos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio y visualizado con un transiluminador.

En la Figura 12 A se observan productos amplificados de los genes *lipL32* y *ompL1* de los cultivos de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae en las diferentes condiciones de crecimiento planteadas en la investigación. La parte B y C de la Figura 13 muestran amplificados del gen *ompL1* de cepas de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae aislada y control ATCC en los diferentes días de crecimiento.

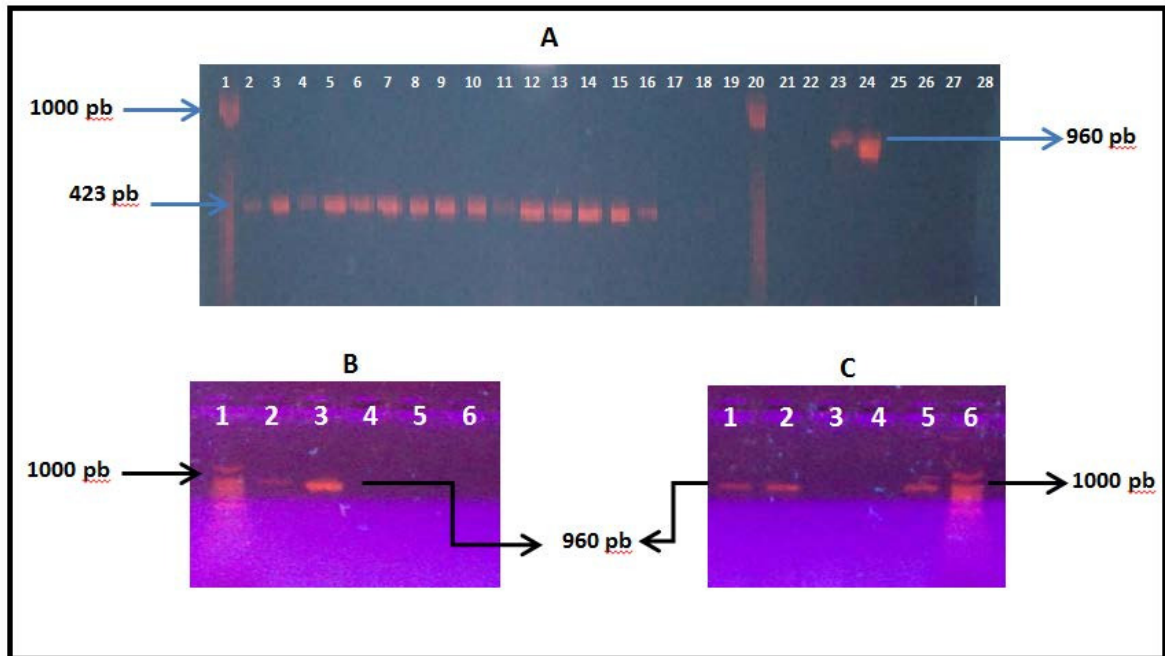


Figura 12. **A. Productos amplificados del gen *lipL32*.** Carril 1: Marcador de peso molecular (100 a 1000pb). Carril 2 y 3: *L. interrogans* aislada medio convencional días 1 y 9. Carril 4 y 5: *L. interrogans* cepa aislada en medio modificado días 1 y 9. Carril 6 y 7: *L. interrogans* cepa control ATCC en medio modificado días 1 y 9. Carril 8 y 9: *L. interrogans* control medio convencional días 1 y 9. Carril 10: *L. interrogans* aislada medio convencional agitado día 2. Carril 11: *L. interrogans* aislada medio modificado agitado día 2. Carril 12: *L. interrogans* control medio modificado agitado día 2. Carril 13: *L. interrogans* control medio convencional agitado día 2. Carril 14: *L. interrogans* aislada convencional agitado día 7. Carril 15: *L. interrogans* control modificado agitado día 7. Carril 16: Control positivo *L. interrogans*. Carril 17 y 18: Controles negativos *L. biflexa* y RNA Humano. Carril: 19: Blanco de reacción. Carril 20: Marcador de peso molecular (100 a 1000pb). **Productos amplificados del gen *ompL1*.** Carril 21: *L. interrogans* aislada medio modificado estático día 1. Carril 22: *L. interrogans* aislada medio modificado día 12. Carril 23: *L. interrogans* control medio modificado día 12. Carril 24: *L. interrogans* cepa control medio modificado agitado día 7. Carril 25: *L. interrogans* aislada de bovino (199). Carril 26: *L. biflexa*. Carril 27: *E. coli*. Carril 28: Blanco de reacción. **B.** Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2. *L. interrogans* cepa aislada convencional estático día 1. Carril 3. *L. interrogans* cepa aislada modificado estático día 12. Carril 4: *L. biflexa*. Carril 5: *E. coli*. Carril 6: Blanco de reacción. **C.** Carril 1: *L. interrogans* cepa control convencional estático día 1. Carril 2: *L. interrogans* cepa aislada convencional agitado día 7. Carril 3: *E. coli*. Carril 4: Blanco de reacción. Carril 5: *L. interrogans* cepa control modificado agitado. Carril 6: Marcador de peso molecular.

La expresión del RNA del gen *ompL1* en la cepa de estudio bajo las diferentes condiciones experimentales no se logró determinar debido a que el tamaño del

amplicón (960 pb) no permite la lectura en las plataformas del termociclador de tiempo real que se utilizó; sin embargo, la presencia del gen se estableció a través de PCR convencional. La especificidad de los amplificadores de *lipL32* y *rrl* obtenidas con el software del equipo de PCR tiempo real se observan en la Figura 13.

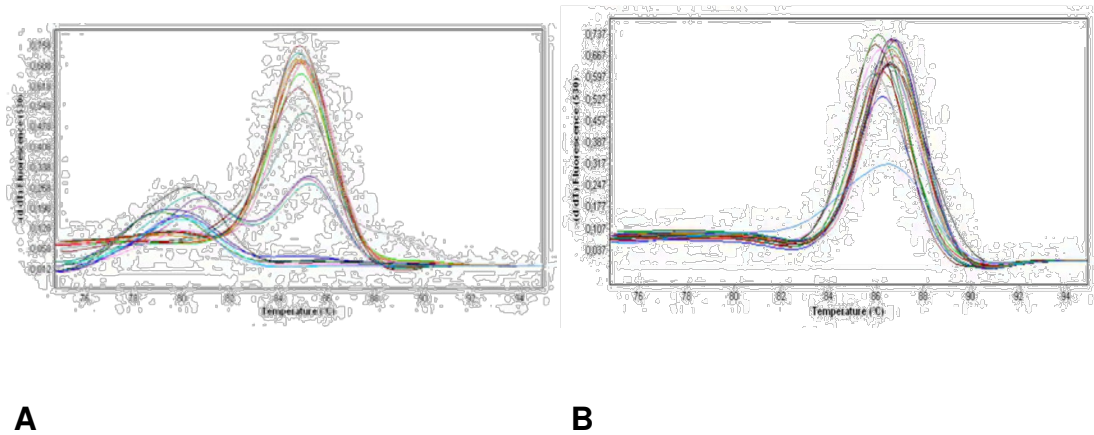


Figura 13. Curvas de disociación (*melting curve* o  $T_m$ ) de los genes de (A) *lipL32* (84°C) y (B) *rrl* (86°C) de cepas de *Leptospira*, obtenidas con el software del termociclador Light Cycler® de Roche®.

Los resultados obtenidos de los niveles de expresión del RNA del gen *lipL32* normalizados con el gen *rrl* (*housekeeping* o normalizador), se lograron establecer con PCR en tiempo real, ver Tabla 9. Los resultados mostraron que bajo las dos condiciones en el medio convencional el gen *lipL32* se expresó en la cepa aislada en los días analizados. Bajo estas mismas condiciones, la expresión del gen en la cepa control tuvo el mismo comportamiento en el medio convencional, y no se expresó el primer día y el valor *Crossing Point* (CP) fue similar en condiciones estáticas y de agitación. En el medio modificado por el contrario el gen presentó una expresión diferente en la cepa aislada y control. En los días establecidos como no determinados por la plataforma de qPCR (ND) no fue posible establecer la tendencia en los niveles de expresión, a pesar que se realizaron diversos ensayos de qPCR y se corroboró la presencia de cDNA con PCR convencional.

Tabla 9. Expresión del RNA del gen *lipL32* normalizados con el gen *rrl* (*housekeeping* o normalizador).

CONDICIÓN	MEDIO	EMJH CONVENCIONAL					EMJH MODIFICADO				
	DÍAS	1	2	7	9	12	1	2	7	9	12
Estática	CEPAS										
	Aislada	4,1			2,0	2,1	9,2			2,9	ND
	Control	ND			3,3	3,6	ND			3,0	3,1
Agitación	Aislada		2,9	1,8				ND	ND		
	Control		ND	3,6				ND	3,7		

†El valor está dado en Unidades Arbitrarias de Expresión obtenidas de la normalización de los valores de *Crossing Point* (CP) del gen de interés (*lipL32*) con el *Housekeeping* (*rrl*). ND: No determinado por la plataforma de PCR tiempo real empleada en el estudio.

La Figura 14 muestra la imagen representativa del gen *lipL32* (423 pb) en muestras de cultivos convencional y modificado de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. Para los productos obtenidos por RT y PCR tiempo real, se realizó una electroforesis utilizando un marcador de pesos molecular (M) con el fin de corroborar el tamaño de los amplificadores. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio y visualizado con un transiluminador.



Figura 14: Electroforesis del gen *lipL32*, fragmentos obtenidos por RT y PCR en tiempo real. Carril 1 Marcador de peso molecular. Carril 2: *L. Icterohaemorrhagiae* aislada convencional día 1. Carril 3: *Icterohaemorrhagiae* aislada modificado día 1. Carril 4: *L. Icterohaemorrhagiae* aislada modificado día 12. Carril 5: *L. Icterohaemorrhagiae* control modificado día 1. Carril 6: *L. Icterohaemorrhagiae* control convencional día 1. Carril 7: *L. Icterohaemorrhagiae* aislada convencional agitado día 2. Carril 8: *L. Icterohaemorrhagiae* aislada convencional agitado día 7. Carril 9: *L. Icterohaemorrhagiae* aislada modificado agitado día 2. Carril 10: *L. Icterohaemorrhagiae* aislada modificado agitado día 7. Carril 11. *L. Icterohaemorrhagiae* control modificado agitado día 2. Carril 12: *L. Icterohaemorrhagiae* control convencional día 2. Carril 13: *L. biflexa*. Carril 14: *E. coli*. Carril 15. Blanco de reacción. Carril 16: Marcador de peso molecular.



## 6. DISCUSIÓN

Las leptospiras se caracterizan porque requieren condiciones nutricionales específicas para su viabilidad y mantenimiento; esto ha generado la realización de diversos estudios que evalúan diferentes fuentes nutricionales para que el medio de cultivo sea selectivo y enriquecido con el fin de garantizar un crecimiento óptimo y eficiente de los microorganismos (González *et al.*, 2003; Cameron *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos mostraron que las cepas de *Leptospira interrogans serovar Icterohaemorrhagiae*, control y aislada de bovino, crecieron y se mantuvieron en el medio de cultivo EMJH modificado al que se le sustituyó el suplemento convencional por un subproducto industrial de desecho que conservó la fuente de carbono y energía, bajo condiciones estáticas y de agitación. Esto concuerda con estudios realizados sobre componentes nutricionales del medio basal EMJH para el crecimiento de estos microorganismos donde se evidencia la presencia de sales de amonio como fuente de nitrógeno, factores de crecimiento, cloruro de sodio y buffer de fosfatos; como también, la adición del suplemento convencional constituido por albúmina sérica bovina y Tween 80 que aporta la fuente principal de carbono y energía (Ratnam, 1994; Faine, 1999; Levett, 2001; Murray *et al.*, 2009; Adler y Moctezuma, 2010). Los resultados obtenidos en este estudio confirman la importancia de los ácidos grasos de cadena larga para el

metabolismo de *Leptospira* spp, los cuales son requeridos como única fuente de carbono y son metabolizados por  $\beta$ -oxidación (González *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2010). El aporte de ácidos grasos a los medios de cultivo ha sido evaluado por González *et al.*, 2003 quienes utilizaron diferentes concentraciones de Tween 80 (1.25 a 5.25 mg/mL) frente a una cepa de *Leptospira interrogans* serovar Mozdok; observando que el crecimiento es adecuado hasta una concentración de 3.25 mg/mL. Este comportamiento frente a concentraciones de Tween 80 inferiores a 3.25 mg/mL, también ha sido observado en el serovar Ballum y Pomona, donde se observó una estimulación del crecimiento para estos serovares (González *et al.*, 2003). Para concentraciones mayores de 3.25 mg/mL se ha determinado un bajo rendimiento celular que se argumenta por una saturación de los ácidos grasos libres; lo cual aumenta la toxicidad y el efecto negativo sobre el crecimiento y la fisiología de *Leptospira* spp, causando células muertas y abundantes detritos (González *et al.*, 2002). Teniendo en cuenta lo anterior, para el medio de cultivo EMJH modificado se utilizó una concentración de 1.25 mg/mL de Tween 80 debido a que los ácidos grasos, son nutrientes esenciales para el crecimiento de *Leptospira* spp *in vitro* (Ricaldi *et al.*, 2008).

Con los datos encontrados en la pruebas físico-químicas de los suplementos, se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los porcentajes obtenidos de proteína, azúcares totales y reductores, humedad, cenizas y grasa, observándose que el suplemento modificado presenta menor porcentaje de proteína, frente al convencional. Este bajo porcentaje de proteína en el suplemento modificado, aporta una rica y balanceada fuente de aminoácidos esenciales, como treonina,

cisteína, metionina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, lisina, histidina y triptófano; encontrándose por literatura, mayor cantidad de leucina y lisina (Ha y Zemel, 2003; Ibrahim *et al.*, 2005). Esto hace pensar, que *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae, no solamente sintetiza los aminoácidos a partir de las sales de amonio (Faine *et al.*, 1999) suministradas por el medio de cultivo, sino que las toma de la fuente suministrada por el medio modificado. De esta manera, se sustentan los resultados en cuanto a crecimiento, debido a que *Leptospira* spp, posee un mecanismo de transporte de aminoácidos libres, dipéptidos y péptidos de bajo peso molecular que permite simultáneamente asimilar una gran cantidad de moléculas nitrogenadas, esto conlleva a un ahorro energético; adicionalmente, la bacteria presenta todos los genes que activan los sistemas enzimáticos para la biosíntesis de aminoácidos (Ren *et al.*, 2003).

Dentro del análisis bromatológico, la humedad y las cenizas son determinantes, porque esto representa la cantidad de agua y el suministro de los micronutrientes en el medio de cultivo, indicando que si estos compuestos químicos presentan afinidad por el agua se favorecen las reacciones metabólicas y aumenta la disponibilidad de los solutos hacia el interior de las células bacterianas (Brooks y Butel, 2005). Los minerales como el calcio, magnesio y potasio son necesarios para el crecimiento de *Leptospira* spp, porque están estrechamente relacionados con condiciones fisiológicas como la estabilidad de la pared, la membrana y los ribosomas (Brooks y Butel, 2005; Johnson *et al.*, 1973; Staneck *et al.*, 1973; Amiot, 1991). Al presentarse un mayor porcentaje de cenizas en el medio modificado con respecto al convencional, se puede explicar que los minerales

presentes en el suplemento modificado pudieron facilitar la viabilidad y el crecimiento de *L. interrogans serovar Icterohaemorrhagiae*.

La adición de micronutrientes a los medios de cultivo para el crecimiento de *Leptospiras* spp tuvo su auge en la década de los 90; sin embargo, son pocas las evaluaciones que se han realizado para los diferentes serovares de *Leptospira* spp; uno de los grandes aportes a la comunidad científica, fue el medio de cultivo bajo o libre de proteína, desarrollado por Russell y Russell en 1978; estos investigadores inocularon cepas de leptospiras patógenas (*L. interrogans*) y saprófitas (*L. biflexa*) en los medios de cultivo propuestos y lograron establecer que los serovares Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Grippotyphosa y Hardjo crecieron en el medio libre de proteínas con adición de cianocobalamina, tiamina, magnesio, manganeso, hierro, zinc, potasio y piruvato obteniendo, a partir de inóculos pequeños ( $10 \times 10^5$  cel/mL), rendimientos celulares de 4 hasta  $11 \times 10^8$  células/mL y entre 5 a 10 días de crecimiento respectivamente. Estos resultados coinciden con los rendimientos celulares de las cepas de *L. interrogans serovar Icterohaemorrhagiae* obtenidos en el medio modificado, probado en este estudio.

En otra investigación realizada por González *et al.*, 2006 se incrementó la concentración de macronutrientes como el hierro y la fuente de carbono en el medio de cultivo EMJH convencional y se determinó que no se estimula el rendimiento de biomasa, ni la velocidad específica de crecimiento; por lo tanto, al aumentar las concentraciones de estos macronutrientes no se limita el

crecimiento, especialmente para las cepas candidatas vacunales del serogrupo Ballum. Esto indica que se deben seguir realizando investigaciones, especialmente con las cepas nativas en el medio modificado propuesto porque no todos los serovares crecen bajo las mismas condiciones.

El aporte de grasa al medio EMJH fue del 0.6% en el suplemento modificado y de 0.1% en el suplemento comercial; esto hace pensar que hay un incremento de concentración de ácidos grasos suministrados en el modificado; además, este contenido en el porcentaje de ácidos grasos presento un número de átomos de carbono similar a los ácidos grasos insaturados y puede explicar por qué se mantuvo el crecimiento de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae con un bajo gasto energético en condiciones estáticas de crecimiento. Es necesario indicar que diversos estudios han evaluado la importancia de los ácidos grasos, especialmente de cadena larga, en el metabolismo de *Leptospira* spp los cuales son requeridos como fuente exógena de lípidos debido a que este microorganismo no es capaz de sintetizar ácidos grasos *de novo*; además, son la fuente principal de carbono y energía (González *et al.*, 2006; Johnson y Walby, 1972).

Los resultados obtenidos del porcentaje de azúcares totales y reductores presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) observándose una mayor cantidad en el suplemento modificado frente al convencional, teniendo en cuenta que *Leptospira* spp, no utiliza los carbohidratos como fuente de energía (González *et al.*, 2003), estos datos son de interés en esta investigación, porque

pueden explicar porque se logró el crecimiento de las cepas de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae en el medio de cultivo modificado; sin embargo, estudios realizados por Ellinghausen, 1968 indican que la incorporación de glucosa al medio EMJH favorece el crecimiento de algunas cepas de *Leptospira* spp; esto indica, que es importante identificar bioquímicamente los carbohidratos presentes en el medio modificado y evaluar su efecto en *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae y en otros serovares para futuras investigaciones con el fin de clarificar la participación de los azúcares en el crecimiento de las cepas.

Los resultados obtenidos de la evaluación cinética mostraron que las cepas de *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae mantuvieron su crecimiento en el medio modificado; lo cual indica que las dos cepas se adaptaron metabólicamente a los compuestos nutricionales ofrecidos por el medio de cultivo modificado. Al comparar los datos de crecimiento obtenidos se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en los medios de cultivo (Anexos 17 y 22).

Con los resultados de los parámetros cinéticos se pudo establecer que la condición de agitación favoreció el rendimiento celular en la cepa aislada y control cultivada en el medio EMJH modificado y convencional, también se observó que la velocidad de crecimiento fue mayor en las dos cepas en el medio convencional, y los tiempos de duplicación fueron menores frente al medio modificado. Estos resultados de rendimiento celular se pueden comparar con los obtenidos por González *et al.*, en el 2003, donde evaluaron la cinética de crecimiento de

*Leptospira interrogans* serovar Ballum y Canicola, en medio de cultivo EMJH bajo condición de agitación con rendimientos celulares de  $2 \times 10^9$  células/mL (Canicola) y  $7 \times 10^8$  células/mL (Ballum) después de 4 días de incubación. Por lo tanto, se observa que *Leptospira* spp es un microorganismo aerobio que requiere de oxígeno, el cual es suministrado por movimiento vigoroso en condiciones de agitación; igualmente, esta condición favorece el crecimiento microbiano debido a que los nutrientes se encuentran distribuidos de manera homogénea en el medio de cultivo (Brooks y Butel, 2005). La cinética de crecimiento de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae también se ha establecido en condiciones estáticas en otros medios de cultivo como Cox, Stuart y Korthof con tiempos de generación de 11.6, 10 y 23.6 horas; logrando determinar que la fase de adaptación se establece a las 24 horas y el final de la fase exponencial el día 11 (Larson *et al.*, 2010); estos resultados coinciden con los obtenidos en este trabajo donde se utilizó el medio EMJH convencional con la cepa aislada de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae y se obtuvo el mismo tiempo para la fase de adaptación y la fase exponencial.

El medio de cultivo modificado utilizado en este estudio permitió el crecimiento y el mantenimiento de las cepas estudiadas; además, se determinó que presenta un bajo porcentaje de proteínas; esto representa un buen aporte debido a que diversos estudios muestran que cepas patógenas, útiles como candidatos vacunales, requieren de medios de cultivo con bajo porcentaje de proteína con el fin de evitar reactogenicidad de pequeñas trazas de proteínas séricas en el

producto biológico contra la leptospirosis (González *et al.*, 2003; González *et al.*, 2002; González *et al.*, 2004). En un estudio realizado por González *et al.*, 2006; se reporta que para la incorporación del *Leptospira interrogans* serovar Ballum en una nueva formulación vacunal resultará de marcado interés la obtención y optimización de un medio libre de proteínas que sustente un buen crecimiento de estas cepas exigentes, sin afectar otras propiedades importantes como su virulencia, antigenicidad e inmunogenicidad. En este sentido, el medio modificado empleado en el presente estudio se puede convertir en un buen producto para evaluar otras cepas vacunales garantizando un crecimiento adaptativo y disminuyendo la posibilidad de reactogenicidad al presentar un bajo porcentaje de proteína.

En cuanto a la identificación de los genes *lipL32* (423 pb) y *ompL1* (960 pb) en las dos cepas de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae, los resultados indicaron la presencia de estos genes asociados con patogenicidad durante el crecimiento bacteriano en los dos medios de cultivo EMJH modificado y convencional bajo condiciones estáticas y de agitación. La presencia de estos genes ha sido confirmada por otros autores, obteniendo productos amplificados en cepas de leptospirosis patógenas y la ausencia de estos en las cepas de *Leptospira saprófitas*; así como, *E. coli* y *Salmonella* spp, utilizadas como controles negativos (Haake *et al.*, 2000; Cullen *et al.*, 2002; Haake *et al.*, 2004; Cullen *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2008; Vivian *et al.*, 2009, Hauk *et al.*, 2009; Levett *et al.*, 2005; Agudelo-Flórez *et al.*, 2009; Mayer-Scholl *et al.*, 2010; Natarajaseenivasan *et al.*, 2005; Vedhagiri *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010); sin



embargo, la relevancia de la lipoproteína LipL32 y la porina OmpL1 se fundamenta en el efecto antigénico que generan, considerándose candidatos vacúnales, debido a que son altamente conservadas en *Leptospiras* patógenas (Haake *et al.*, 1999; Seixas *et al.*, 2007; Hauk *et al.*, 2008).

Con este trabajo se logró estandarizar la técnica de PCR en tiempo real permitiendo realizar un análisis en la expresión génica, por lo tanto, el gen *lipL32* se expresó en la cepa aislada en el medio convencional y mantuvo la expresión durante los días seleccionados de crecimiento en condiciones estáticas y de agitación; mientras que la expresión del gen en la cepa control se expresó en el medio convencional y en las dos condiciones de cultivo, excepto el primer día que no se detectó en condiciones estáticas ni de agitación. Los resultados en la expresión del gen en el medio modificado en ambas cepas y en las dos condiciones presentaron una expresión diferente. Estos resultados confirman que la expresión es regulada hasta niveles no detectables durante la infección *in vivo* o en condiciones *in vitro* que imitan el ambiente hospedero, tales como las temperaturas superiores a 30 °C, la limitación de hierro, y la osmolaridad (Haake *et al.*, 1998; Barnett *et al.*, 1999; Cullen *et al.*, 2002; Lo *et al.*, 2006; Matsunaga *et al.*, 2007).

Con este trabajo a pesar de que se pretendía solamente establecer si había o no expresión del gen se logró establecer de manera preliminar el comportamiento de la expresión del gen en los dos medios de cultivo, indicando que el más alto nivel de expresión en la fase lag, lo obtuvo la cepa aislada en el medio modificado

durante el crecimiento en condiciones estáticas, esto concuerda con un estudio realizado con cepas patógenas de *Leptospira* spp en donde mostraron que existen altos niveles de expresión del gen *lipL32* tanto *in vitro* como *in vivo* (Haake *et al.*, 2000), lo que despierta interés para el diagnóstico debido a la expresión del gen en cepas de *Leptospira* cultivadas en el medio modificado y utilizando la técnica en tiempo real útil para el diagnóstico temprano de la enfermedad (Guerreiro *et al.*, 2001). En un estudio realizado por Ko *et al.*, 2009, se afirma que en el cultivo *in vitro*, no se dan los niveles más altos de expresión del gen *lipL32*; sin embargo, en este trabajo se lograron establecer niveles altos de expresión del gen *lipL32* en las dos cepas de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae en los medios de cultivo EMJH modificado y convencional bajo condiciones estáticas del cultivo *in vitro*, lo cual es de importancia en la investigación y aporta sustancialmente a la comunidad científica. Por último se observó que la expresión del gen disminuyó en la cepa aislada en los dos medios de cultivo bajo condiciones estáticas durante el crecimiento, esto coincide con un reporte de Vieira *et al.*, 2009, en donde se establece que *Leptospira* spp, es difícil de cultivar y la expresión se ve afectada después de un largo período de crecimiento en el medio de cultivo; explicando la expresión diferencial de los factores de virulencia esenciales se pueden afectar y suprimirse de acuerdo con las condiciones ambientales.

## 7. CONCLUSIONES

1. El subproducto industrial utilizado en el medio de cultivo EMJH modificado permitió confirmar la buena calidad microbiológica durante los procesos tecnológicos de fabricación aplicando las buenas prácticas de manufactura. Además se logró en este medio modificado el crecimiento y mantenimiento de cepas de *Leptospiras interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae de difícil crecimiento por las exigencias nutricionales y la complejidad metabólica de la bacteria.
2. Químicamente se determinó que el medio modificado presentó un bajo porcentaje de proteínas, con respecto al convencional, esto despierta interés en la comunidad científica debido a que no necesita de suero o albúmina sérica bovina los cuales pueden generar reactogenicidad y aumentar considerablemente los costos, afectando el escalado en la producción de vacunas.
3. Las dos cepas de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae se mantuvieron y crecieron en los dos medios de cultivo, indicando la viabilidad de las cepas; sin embargo, se observaron mejores rendimientos celulares y velocidad de crecimiento en el medio convencional frente al modificado; la diferencia en estos parámetros cinéticos se puede explicar por los distintos porcentajes en los componentes químicos de los suplementos empleados.

4. En condiciones estáticas y de agitación las dos cepas de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae cultivadas en el medio modificado y convencional expresaron los genes asociados con patogenicidad durante la mayoría de días de las fases de crecimiento bacteriano.
  
5. Este trabajo se presenta como una contribución importante en el desarrollo de medios de cultivo modificados que permitan el crecimiento y mantenimiento de cepas de *Leptospira* spp sin afectar la expresión de genes asociados con patogenicidad.

## 8. PROYECCIONES

Con los resultados obtenidos del presente trabajo se pueden plantear nuevas investigaciones que permitan:

1. Establecer si existe expresión diferencial de los genes estudiados realizando cuantificación de la expresión del RNA en las diferentes fases de crecimiento bacteriano y bajo las condiciones planteadas en este trabajo.
2. Determinar si los resultados de crecimiento y expresión de genes asociados con patogenicidad *in vitro* se pueden escalar para aprovechar esta información a nivel industrial.
3. Evaluar bajo el modelo de crecimiento y expresión realizado en este trabajo diferentes modificaciones al medio probado que permitan optimizar el crecimiento de otras cepas de *Leptospira* spp debido a la dificultad en su cultivo y mantenimiento por las exigencias nutricionales de cada serovar y por el lento crecimiento de este microorganismo.

## 9. RECOMENDACIONES

1. Para la realización del recuento microbiano se aconseja utilizar formol al 10% en solución salina con el fin de facilitar la lectura debido a la movilidad de las *Leptospira* spp.
2. Se recomienda para futuras investigaciones utilizar un set de primers que generen un producto de menos de 500 pb, para establecer el perfil de expresión de la porina OmpL1 debido a que la plataforma del sistema LightCycler® no permite la detección de amplicones de un tamaño mayor a 750 pb, y el tamaño del producto esperado de este gen es de 960 pb.
3. Es necesario seguir evaluando la expresión de los genes *lipL32*, *ompL1* y otros genes asociados con patogenicidad en diferentes cepas de *Leptospira* spp en el medio de cultivo modificado para validar la técnica de qPCR y evitar el uso de animales de experimentación.

## LISTA DE REFERENCIAS

- Acha, P., Szyfres, N., Boris. (2001). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud. 3 edición. Volumen I. Bacteriosis y Micosis. Washington, D.C. Págs. 175-186.
- Adler, B., De la Peña A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 140:287-96.
- Adler, B., Moctezuma, A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol* 140(3–4):287–296. Overview of the biology of *Leptospira* and how recent progress in genetic research will contribute to our understanding of *Leptospira* pathogenesis. [PubMed: 19345023].
- Agampodi, S., Peacock, SJ. Thevanesam, V. (2009). The potential emergence of leptospirosis in Sri Lanka. *Lancet Infect Dis.* 9:524-6.
- Agudelo-Flórez, P., Londoño, A.F., Quiroz, V.H., Angel, J.C., Moreno, N., Loaiza, E.T., Muñoz, L.F. y Rodas, J.D. (2009). Prevalence of *Leptospira* spp. In Urban Rodents from a Groceries Trade Center of Medellin, Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 81(5), 906-910.
- Ahmed, N., Devi, SM., Valverde, M., de L., *et al.* (2006). Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob;* 5:28. [PubMed: 17121682].
- Aider, M., D, Halleux and I. Melnikova. (2009). Skim acidic milk whey cryoconcentration and assessment of its functional properties: Impact of processing conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10(3): 334-341.
- Alan, J.A., McBridea, Gustavo M., Cerqueira, B., Marc, A., Suchardcde, Angela N., Moreirab, Richard L., Zuerner, Mitermayer G., Reisa, David A., Haake, Albert ., Koa and Odir A., Dellagostinb. (2009). Genetic diversity of the *Leptospiral* immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. *Infect Genet Evol.* March; 9(2): 196. doi:10.1016/j.meegid.2008.10.012. *Infect Genet Evol.* Author manuscript; available in PMC 2010 January 28.
- Almeida, K.E., A.Y. Tamime and M.N. Oliveira. (2009). Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology* 42(2): 672–678.

- Alves, UAF., Siqueira, SA y Pestana CB. (1989). Patología da Leptospirosis. Analise critica dos aspectos morfológicos e imunohistoquímica relevantes para a compresão da patogenia. *Rev Inst. Adolfo Lutz* 49 (1):75-80.
- Amiot, J. (1991). Ciencia y Tecnología de la leche. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España. ISBN 84-22-0713-7.
- AOAC 991.20. Método volumétrico Kjeldahl.
- Atzingen, MV., Barbosa AS., De Brito T., *et al.* (2008). Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. *BMC Microbiol*; 8: 70.
- Babudieri, B., and O. Zardi. (1960). Studies on the metabolism of leptospirae. I. Vitarnin B12 as a growth factor. *Z. Vitam. Horm. Fermentforsch.* 11:300-309.
- Balen J A., Hoet A., D'Pool G., Gil M., Escalona F., Díaz D. (2009). Análisis retrospectivo de las pruebas diagnósticas de leptospirosis bovina procesadas en la unidad de investigación y diagnóstico de leptospirosis de la Universidad de Zulia, 1998- 2001. *Revista científica, FCV-Luz/ Vol. XIX. No 6, 598-606.*
- Baquero, M. Gómez A., Hernández P. (2010). Aspectos moleculares relevantes de las proteínas de patogenicidad de *Leptospira sp.* *Revista de Medicina Veterinaria* No 19. Enero – Junio. Págs 101-111.
- Barnett, J., Barnett, D., Bolin, A., Summers, T.A., Wagar, E.A., Cheville, N.F., Hartskeerl, R.A., Haake, D.A. (1999). Expression and Distribution of Leptospiral Outer Membrane Components during Renal Infection of Hamsters. *Infection and Immunity.* 67(2), 853-861.
- Barocchi, M. A., Ko, A. I., Reis, M. G., McDonald, K. L. & Riley, L. W. (2002). Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but non intracellular pathogen. *Infect. Immun.* 70, 6926–6932 .This study found that *Leptospiras* rapidly translocate across polarized cell monolayers by invading host cells and transiently residing in the cytoplasmic compartment.
- Barrochi, M; Ko, A; Ramos, S; Tucunduva, M; Galvao, M; Riley, L. (2001). Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar copenhageni and application to PCR-based differentiation of *Leptospira* serogroups. *Journal of Clinical Microbiology.* 39(1): 191-195.
- Baseman, J.B., Henneberry R.C., Cox C.D. (1966). Isolation and growth of *Leptospira* on artificial media. *Journal of Bacteriology.* Vol. 91. No3.



- Bharti, AR., Nally JE., Ricaldi JN., Matthias MA., Diaz MM., et al. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 3: 757–771.
- Blaha, Thomas. (1995). Epidemiología especial veterinaria. Ed. Acribia S.A. Zaragoza. España. 128-136.
- Boisier, P., Berger, F., Bourhy, P., Guillard, B., Guyomard-Rabenirina, S., Kouadio, K., Picardeau, M., Goarant, C. (2011). Networking to implement diagnostic capacity and (re-) evaluate the public health importance of leptospirosis in the Institute Pasteur International Network.
- Bolin, C., David, P. (2001). Use of a monovalent leptospiras vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. *Am. J. Vet. Res.* 62(7):995-1000.
- Bomfim, M., Barbosa-Stancioli E., Cota M. (2007). Detection of pathogenic leptospire in urine from naturally infected cattle by nested PCR. *The Veterinary Journal*, 178(2):251- 256.
- Branger, C., Blanchard, B., Fillonneau, C., Suard, I., Aviat, F., et al. (2005) Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. *FEMS Microbiol Lett* 243: 437–445.
- Brihuega, B., Cachione, R., Durlach. (2006). Patogenia de la leptospirosis experimental. Temas de zoonosis III. Asociación Argentina de Zoonosis. Buenos Aires. Pag 165-169.
- Brooks, G., Butel, J. (2005). Morse S. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick, Adelberg. 18<sup>a</sup> ed. Ediciones Manual Moderno. México.
- Brown, PD., Gravekamp, C., Carrington, DG., Van de Kemp H., Hartskeerl RA., Edwards, CN., Everard, COR., Terpstra and Levett PN. (1995). Evaluations of the polymerase chain reaction for early diagnosis of Leptospirosis. *J Med Microbiol* 43:110-114.
- Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW (2005). Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *J Mol Endocrinol* 34:597–60.
- Cameron, C.E., Zuerner, R L., Raverty, S., Colegrove, K M., Norman, S A., Lambourn, D M., Jeffries, S J., Gulland, F M. (2008). Detection of Pathogenic *Leptospira* Bacteria in Pinniped Populations via PCR and Identification of a Source of Transmission for Zoonotic Leptospirosis in the Marine Environment. *Journal of Clinical Microbiology*, May, p 1728-1733.

- Cerqueira, GM., McBride, AJ., Queiroz, A., et al. (2010). Monitoring *Leptospira* strain collections: The need for quality control. *Am J Trop Med Hyg*; 82:83–87.
- Cerquiera, GM., Picardeau, M. (2009). A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol* 9: 760 – 768.
- Céspedes, M. (2005). Leptospirosis: enfermedad zoonótica reemergente. *Rev. Peri. Med Exp Salud Pública*. 22 (4): 290-307.
- Céspedes, M., Tapia R., Balda, Lourdes., González, D., Peralta, C., Condori P. (2007). Estandarización y validación de una prueba de PCR para el diagnóstico precoz de Leptospirosis humana. *Rev. Peru*; 24(1): 20-26.
- Chan, B., Dodsworth, N., Woodrow, J., Tucker A., Harris R. (1995). Site specific N terminal auto degradation of HSA. *Eur. J. Biochem.*; 227(1-2):524 -8.
- Chen, F., Fan, Q., Qiu, W., Yin, G., Xing Y. (2010). Cloning and Analysis of the sequence of Outer Membrane Protein Gene of a serovar *Leptospira Canicola interrogans*, *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*. 6,55-59.
- Cohn, E., Strong, E., Hughes, L., Mulford, J., Ashworth, N., et al. (1946). "Preparation and properties of serum and plasma proteins." *J. Am. Chem. Soc.*; 68:459- 475.
- Corbeil, L. (2001). Immunity to bovine reproductive infections. *Vet. Clin. of North Amer: Food Anim. Pract.*17(3):567-583.
- Crece el reporte de leptospirosis en Colombia. 29 de Septiembre de 2010. En [http://www.eltiempo.com/vidadehoy/.../leptospirosis-en-Colombia\\_801374](http://www.eltiempo.com/vidadehoy/.../leptospirosis-en-Colombia_801374).
- Cullen PA, Haake DA, Bulach DM, Zuerner RL, Adler B. (2003). LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect. Immune* 71:2414–2421. [PubMed: 12704111].
- Cullen PA, Xu X, Matsunaga J, Sánchez Y, Ko AI, Haake DA, Adler B. (2005). Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infect. Immune*; 73:4853–4863. [PubMed: 16040999].
- Cullen, P. A., Cordwell, S. J., Bulach, D. M., Haake, D. A. & Adler, B. (2002). Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect. Immun.* 70, 2311–2318
- Dassanayake DL, Wimalaratna H., Agampodi SB., Liyanapathirana VC., Piyarathna TA., Goonapienuwala BL., (2010). Evaluation of surveillance case definition in the diagnosis of leptospirosis, using the microscopic

- agglutination test: a validation study. *BMC Infects Dis.* (PubMed: 19386085).
- Davis, B. D. (1947). The preparation and stability of fatty acid-free polyoxyethylene sorbitan monooleate ("Tween" 80). *Arch. Biochem.* 15:359-364.
  - De silvestri J.A. (2002). *Manual de Microbiología de Alimentos.* Universidad de la Salle.
  - Dheda K, Huggett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin SA, Johnson MA, Rook GAW, Zumla A (2005). The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal Biochem* 344:141–143.
  - Diamond, L.K., Denton, R.L. (1945). "Rh agglutination in various media with particular reference to the value of albumins." *J. Lab. Clin. Med.*; 30:821-829.
  - Dinger, J. E. (1932) *Geneesk. T. Ned.-Ind.*, 72, 1511.
  - Ellinghausen. C, JR, and McCullough. G. (1965). Nutrition of *Pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am. J. Vet. Res.*, 26, 45.
  - Ellis, W. A., K. Hovind-Hougen, S. Moller, and A. Birch-Andresen. (1983). Morphological changes upon subculturing of freshly isolated strains of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A* 255:323–335.
  - Evangelista K.V. Coburn J. (2011). *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol.*; 5(9):1413-1425. Doi: 10.2217/fmb. 10.102.
  - Faine S, (1982). Guidelines for the control of Leptospirosis. World Health Organization Offset, publication N° 67.
  - Faine, S. (1959). Iron as a growth requirement for pathogenic *Leptospira*. *J. Gen. Microbiol.* 20:246-251.
  - Faine, S.; Adler, B.; Bolin, C.; Perolat, P. (1999). *Leptospira* and Leptospirosis. 2. Medisci; Melbourne, Australia.
  - Faria MT, Calderwood MS, Athanazio DA, McBride AJ, Hartskeerl RA, et al. (2008). Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Act Trop* 108: 1–5.
  - Flannery B, Costa D, Carvalho FP, Guerreiro H, Matsunaga J, da Silva ED, Ferreira AGP, Riley LW, Reis MG, Haake DA, Ko AI. (2001). Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent

- assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol*; 39:3303–3310. [PubMed: 11526167]
- Gallego, M.I.; Gallego, J.F. (1994). Leptospirosis bovina Diagnóstico y control. *Revista del CEISA*. 1 (1-2):48-68.
  - Ghasemi, M., G. Najafpour, M. Rahimnejad, P. Aeineh, M. Sedighi and B. Hashemiyeh. (2009). Effect of different media on production of lactic acid from whey by *Lactobacillus bulgaricus*. *African Journal of Biotechnology* 8(1): 081-084.
  - Ginebra OA. (2001). *Microbiología y Parasitología Médica*. La Habana: Ciencias Médicas.
  - Givens, D.M. A. (2006). Clinical, Evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. *Theriogenol*. 66:648-654..
  - Givens, D.M.; Marley, M.S.D. (2008). Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenol*. 70:270-285.
  - González, A., Rodríguez, Y., Batista, N., Valdés, Y., Núñez, J., González, M., (2005). Evaluación de la potencialidad vacunal de 2 cepas de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum. *Rev. Cubana Med Trop*; 57(1):63-4.
  - González. A, Batista N, Valdés. Y, González. M (2002). Crecimiento, Virulencia y Antigenicidad de *Leptospira interrogans* serovar mozdok. *Revista Cubana Medicina Tropical*. Instituto Carlos J. Finlay 54(1):32-6.
  - González. A, Borrero. R, Ruiz. J, Batista. N, Fernández .Y. (2006). Medio EMJH modificado para el cultivo de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum. *Revista Argentina de Microbiología*. ISSN 0325-7541. 38:61-68.
  - González. A, Rodríguez Y. Batista N, Valdés. Y, González. M (2003). Caracterización microbiológica de cepas candidatas vacunales de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum. *Revista Cubana Medicina Tropical*. Instituto Carlos J. Finlay 55.146-52.
  - Green-McKenzie. (2011). Leptospirosis. En <http://www.emedicine.com/emerg/topic856.htm>.
  - Griffiths, I.B.; Gallego, M.I.; Villamil, L.C. (1982). Factores de infertilidad y pérdidas económicas en ganado de leche en Colombia. *Boletín Técnico ICA*, 00-2.2 94.82. 169 p.
  - Guerreiro, H., J. Croda, B. Flannery, M. Mazel, J. Matsunaga, M. Galvao Reis, P. N. Levett, A. I. Ko, and D. A. Haake. (2001). Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect. Immun*. 69:4958–4968.

- H. A. Lechavelier (ed.), CRC (2001). Handbook of microbiology, 2nd ed, vol. 1. CRC Press, Cleveland, Ohio.
- Ha, E., Zemel, M. (2003). Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 14(5): 251- 258.
- Haake D. A, Suchard M.A, Kelley M.M, Dundoo , Manjula A, Zuener R. (2004). Molecular Evolution and Mosaicism of Leptospiral Outer Membrane Proteins Involves Horizontal DNA Transfer. *Journal of Bacteriology*, 186 No 9: 2818-2828.
- Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA. (2000). The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun*; 68:2276–2285. [PubMed: 10722630].
- Haake DA, Martinich C, Summers TA, Shang ES, Pruetz JD, McCoy AM, Mazel MK, Bolin CA. (1998). Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection. *Infect. Immune*; 66:1579–1587. [PubMed: 9529084].
- Haake, D. A. (2000). Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology* 146:1491–1504.
- Haake, D. A. et al. (1993). Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. *J. Bacteriol.* 175, 4225–4234
- Haake, D. y Matsunaga, J. (2002). “Characterization of the Leptospiral Outer Membrane and Description of Three Novel Leptospiral Membrane Proteins”. *Infect. Immun.* 70. 9: 4936–4945.
- Haake, D.A., Mazel, M.K., McCoy, A.M., Milward, F., Chao, G., Matsunaga, J., Wagar, E.A. (1999). Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infection and Immunity.* 67(12),6572-6582.
- Haake, D; et al. (1993). “Molecular Cloning and Sequence. Analysis of the Gene Encoding OmpL1, a Transmembrane Outer Membrane Protein of Pathogenic *Leptospira* spp”. *J. Bacteriol.* 175. 13: 4225–4234.
- Hao, Yu Lee. (1979). “A simple method for the preparation of human serum albumin. *Vox Sang.* 36:313-320.
- Hartmann, K, Greene, CE (2007). Enfermedades provocadas por infecciones bacterianas sistémicas. En: Tratado de Medicina interna

veterinaria. Ettinger, S. & Feldman, E. Sexta edición. Elsevier Saunders, pp: 616-631.

- Hartskeerl RA, Smits HL, Korver H, Goris MG and Terpstra. (2000). International course on Laboratory Methods for the Diagnosis of Leptospirosis. Royal Tropical Institute, Dept of Biomedical Research. Amsterdam the Netherlands.
- Hartskeerl, R.A., Pereira, M., Ellis, W.A. (2011). Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect*; 17:494-501.
- Hauk P, Guzzo CR, Román Ramos H, Ho PL, Farah CS. (2009). Structure and calcium-binding activity of LipL32, the major surface antigen of pathogenic *Leptospira* sp. *J Mol Biol*; 390:722–736. [PubMed: 19477185]
- Hauk P, Macedo F, Romero EC, et al. (2008). In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the Terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. *Infect Immune*; 76(6):2642–2650. [PubMed: 18391007].
- Heath S.E., Johnson R. (1994). Leptospirosis. *JAVMA* 205, 1518-1523.
- Hernández-Rodríguez, P. Rodríguez, M., Escobar, M. (2001) Leptospirosis: una zoonosis que afecta principalmente a humanos y bovinos. *Revista de la Universidad de la Salle* 32:75-89.
- Hernández-Rodríguez, P. y Rodríguez M. (2003) Microorganismos transmitidos por animales al hombre y sus implicaciones sistémicas y oculares. *Revista científica de la salud visual “Franja Visual”* 13(68),6-11
- Hernández-Rodríguez, P., Díaz, C., Dalmau, E. y Quintero, G. (2011). A comparison between Polymerase Chain Reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. *Journal of Microbiological Methods*. 84(1), 1-7.
- Hernández-Rodríguez, P., Quintero, G., Díaz, C. y Dalmau, E. (2008a) Comparación del cultivo microbiológico y visualización por campo oscuro para el diagnóstico de leptospirosis en bovinos de la Sabana de Bogotá. *Revista de Investigación. Universidad de La Salle*. 8(1) ,9-15.
- Hernández-Rodríguez, P., Quintero, G., Díaz, C. y Dalmau, E. (2008b) Evaluación comparativa de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con técnicas microbiológicas y serológicas para el diagnóstico de Leptospirosis en Bovinos de la Sabana de Bogotá. (Informe final de proyecto). Bogotá: Universidad de La Salle.

- Herrera J C., Vergara C., Romero C., Falconar A. (2005). Comportamiento de la leptospirosis en el departamento del Atlántico (Colombia). *Salud Uninorte*. Barranquilla; 20: 18-29.
- Hoke DE, Egan S, Cullen PA, Adler B. (2008). LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. *Infect Immune*; 76(5):2063–2069. [PubMed: 18285490]
- Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A et al. (2006). Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria: a comprehensive pro-poor health policy and strategy for the developing world. *PLoS Med*; 3: e102.
- Huggett J, Dheda K, Bustin SA, Zulma A (2005) Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes Immune* 6:279–284.
- Hutner, S. H., H. Baker, S. Aaronson, H. A. Nathan, E. Rodriguez, S. Lockwood, M. Sanders, and R. A. Petersen. (1957). Growing *Ochromonas malhamensis* above 35°C. *J. Protozool.* 4:259-269.
- Ibrahim, F., E. Babiker, N. Yousif and A. Tinay. (2005). Effect of fermentation on biochemical and sensory characteristics of sorghum flour supplemented with whey protein. *Food Chemistry* 92(2): 285-292.
- Instituto Finlay. (2002). Procedimientos Normalizados de Operación (PNO). Preparación del medio libre de proteínas para los serogrupos Pomona, Canicola e Icterohaemorrhagiae (PNO) 17-048, 17-049 y 17-050).
- Instituto Nacional de Salud. Bogotá. Colombia (2011). Circular No 007. 28 de Enero. Fortalecimiento de la vigilancia y control de leptospirosis.
- Instituto Nacional de Salud. Lima. Perú. (2006). Año 3; Número 0613: 2.
- ISO 2446. Método para determinar el contenido de grasa. Método de Gerber.
- Jawetz E. Melnick JL. Adelberg EA. Microbiología Médica. (1996). 15va ed. México D.F: Ed. El Manual Moderno.
- Jiménez L. (2006). Revisión actualizada sobre métodos de identificación y diagnóstico de leptospirosis en Bovinos (Tesis). Universidad Javeriana.
- Johnson MA, Smith H, Joseph P, Gilman RH, Bautista CT, et al. (2004) Environmental exposure and leptospirosis, Peru. *Emerg Infect Dis* 10: 1016–1022.
- Johnson RC, Harris VG. (1967). Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire. I. Growth at low temperature. *J Bacteriol* ; 92:27-31
- Johnson, R. C., and N. D. Gary. (1963). Nutrition of *Leptospira Pomona*. II. Fatty acid requirements. *J. Bacteriol.* 85:976-982.

- Johnson, R. C., and N. D. Gary. (1962). Nutrition of *Leptospira Pomona*. I. A chemically defined substitute for the rabbit serum ultrafiltrate. *J. Bacteriol.* 83:668-672.
- Johnson, R. C., J. K. Walby, R. A. Henry, and N. E. Auran. (1973). Cultivation of parasitic leptospires: effect of pyruvate. *Appl. Microbiol.* 26:118-119.
- Kabat, E.A. (1968). *Inmunoquímica experimental*. Prensa Médica Mexicana, I Edición, México, 5-167.
- Kantilaras, C; Khanthong, B; Olson, J; Hoang, K; Narain, P; Insisiengmay, S; Watt, D; Beecham J; Corwin, A. (2002). The importance of leptospirosis in Southeast Asia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 67(3):278-286.
- Ko A., Goarant C., Picardeau M. (2009). *Leptospira*: the dawn of molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*; 7:736-746 (Pub Med: 19756012).
- Koizumi N , Uchida M , Makino T , Taguri T , Kuroki T , Muto M , Kato Y , Watanabe H . (2009). Isolation and characterization of *Leptospira* spp. from raccoons in Japan. *J Vet Med Sci* 71: 425 – 429.
- Koizumi N, Watanabe H. (2003). Molecular cloning and characterization of a novel leptospiral lipoprotein with OmpA domain. *FEMS Microbiol. Lett*; 226:215–219. [PubMed: 14553914]
- Korthof G. (1932). Experimentelles schlammfieber beim menschen. *Zentr Bakteriol Parasitenk Abt I Orig A*; 125:429.
- Labuza, T. (2004). Predictive Microbiology Principles. Department of Food Science and Nutrition. University of Minnesota. USA. Pp. 12.
- Larson A.D. Treick R.W. Edwards C.L. *et al.* (2010). Growth studies and plate counting of Leptospirosis. *J. Bacteriol.* 77(3):361-366.
- Lee, S. H. *et al.* (2000). Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar *lai*. *Gene* 254, 19–28. Together with reference 102, the first description of LipL32, the major surface-exposed protein of pathogens.
- Leon A, Pronost S, Tapprest J, Foucher N, Blanchard B. (2006). Identification of pathogenic *Leptospira* strain in tissues of premature foal by use of polymerase chain reaction analysis. *J. Vet Diagn Invest*; 18: 218-221.
- Leon A., Pronost S., Taprest J., Foucher N., Blanchard B. (2006). Identification of pathogenic *Leptospira* strain in tissues of premature foal by use of polymerase chain reaction analysis. *J. Vet Diagn Invest*; 18: 218-221.



- Leptospirosis. (2006). Disease Information. Division of bacterial and mycotic. En:www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/leptospirosis\_g.htm.
- Levett P. (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (2): 296–326. [PubMed: 11292640].
- Levett P. (2003). Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clinical Infectious Disease* 36(4): 447-52.
- Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, et al. (2005). Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol* 54: 45–49.
- Li, C., Motaleb, M. A., Sal, M., Goldstein, S. F. & Charon, N. (2000). Gyration, rotations, periplasmic flagella: the biology of spirochete motility. *J. Mol. Microbiol. Biotechnology*. 2, 345–354
- Lin, Y. y Chang, Y. (2007). “A domain of the *Leptospira* LigB contributes to high affinity binding of fibronectin”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362. 2. 443–448.
- Liu, Y., Zheng, W., Li, L., Mao, Y. & Yan, J. (2007). Pathogenesis of leptospirosis: interaction of *Leptospira interrogans* with in vitro cultured mammalian cells. *Med. Microbiol. Immunol.* 196, 233–239.
- Lo M, Bulach DM, Powell DR, Haake DA, Matsunaga J, Paustian ML, Zuerner RL, Adler B (2006) Effects of temperature on gene expression patterns in *Leptospira interrogans* serovar Lai as assessed by whole-genome microarrays. *Infect Immun* 74:5848–5859.
- Londoño, M. (2006). Aprovechamiento del suero ácido de queso doble crema para la elaboración de quesillo utilizando tres métodos de complementación de acidez con tres ácidos orgánicos. *Perspectivas en nutrición humana. Revista Perspectivas en Nutrición Humana-Escuela de Nutrición y Dietética-Universidad de Antioquia* 16: 11-20.
- Londoño, M., J. Sepúlveda, A. Hernández y J. Parra. (2008). Bebida fermentada de suero de queso fresco inoculada con *Lactobacillus casei*. *Revista Facultad Nacional Agronomía Medellín* 61(1): 4409-4421.
- Lourdault, K., Aviat, F. & Picardeau, M. (2009). The use of quantitative real-time PCR to study the dissemination of *Leptospira interrogans* in the guinea pig infection model of leptospirosis. *J. Med. Microbiol.* 58, 648–655.
- Louvel, H.S. Bommezzadri, Zidane. N, Boursaux-Eude, Creno. S, Magnier. A, Rouy Z, Me´digue. C, Saint Girons. I, Bouchier. C, and Picardeau.M. (2006). Comparative and Functional Genomic Analyses of Iron Transport

and Regulation in *Leptospira* spp. Journal of Bacteriology. Nov, p. 7893–7904.

- Macías J, Vergara C, Romero C, Falconar A K. (2005). Comportamiento de la leptospirosis en el departamento del Atlántico (Colombia), enero de 1999 a marzo de 2004. Salud Uninorte Barranquilla (Colombia). 20:18-29.
- Mandell, Gerald. Bennett, John E. Dolin, Raphael. Principles and practice of infectious diseases. (2000). 5 Edition. Vol 2. Churchill Livingstone. 2495-2500.
- Masuzawa T , Okamoto Y , Une Y , Takeuchi T , Tsukagoshi K , Koizumi N , Kawabata H , Ohta S , Yoshikawa Y. (2006) . Leptospirosis in squirrels imported from United States to Japan . Emerge Infect Dis 12: 1153 – 1155.
- Matsunaga J, Werneid K, Zuerner RL, Frank A, Haake DA. (2006). LipL46 is a novel surface-exposed lipoprotein expressed during leptospiral dissemination in the mammalian host. Microbiology; 152:3777–3786. [PubMed: 17159228].
- Matsunaga, J. et al. (2003). Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol. Microbiol.* 49, 929–945.
- Matsunaga, J. et al. (2007). Response of *Leptospira interrogans* to physiologic osmolarity: relevance in signaling the environment-to-host transition. *Infect. Immun.* 75, 2864–2874. References 94 and 116 both found that physiological osmolality is a key environmental signal for the differential regulation of leptospiral genes.
- Matthias MA, Levett PN (2002) Leptospiral carriage by mice and mongooses on the island of Barbados. *West Indian Med J* 51: 10–13.
- Matthias MA, Ricaldi JN, Cespedes M, Diaz MM, Galloway RL, et al. (2008). Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis* 2:e213.
- McBride AJA, Athanazio DA, Reis MG et al. (2005). Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis*; 18: 376–386.
- McCurry J. (2009). Philippines struggle to recover from typhoons. *Lancet*; 9700: 1489.
- Merien F, Amouriauz P, Perolat P, et al. (1992). Polymerase chain reaction for detection of
- Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, et al. (2005) A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett* 249: 139–147.

- Merien FJ, Baranton G and Perolat P. (1995). Comparison of polymerase Chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *J Infect Dis* 172:281-285.
- Ministerio de Protección Social e Instituto Nacional de Salud (2000). Hechos en vigilancia en Salud Pública. Situación actual de la leptospirosis en el País. Colombia. INS.
- Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Ministerio de la Producción y el Comercio. Sistema Autónomo de Sanidad Animal (SASA). Instituto Nacional de Higiene "RAFAEL RANGEL". (2003). Guía de Procedimientos para el Diagnóstico y Control de la Leptospirosis en Venezuela. Caracas, Venezuela. 45 pp.
- Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Ministerio de la Producción y el Comercio. Sistema Autónomo de Sanidad Animal (SASA). (2003). Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Guía de Procedimientos para el Diagnóstico y Control de la Leptospirosis en Venezuela. Caracas, Venezuela. 45 pp.
- Monahan, A. M., Callanan, J. J. & Nally, J. E. (2008). Proteomic analysis of *Leptospira interrogans* shed in urine of chronically infected hosts. *Infect. Immun.* 76, 4952– 4958.
- Moncada Myriam. (2005). Manual de Prácticas de Bioquímica de Alimentos. Universidad de La Salle.
- Montufar E. B., Almirall A., Palmqvist A., Traykova T., Planell J. A y Ginebra M.P. (2006). «Obtención de andamios macroporosos para regeneración ósea a partir del espumado de cementos de fosfato de calcio.» XXIX Congreso de la Sociedad Ibérica de Biomecánica y Biomateriales. Reus.
- Muñí, A., G. Páez, J. Faría, J. Ferrer y E. Ramones. (2005). Eficiencia de un sistema de ultrafiltración/ nanofiltración tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración del lactosuero. *Revista Científica* 15(4): 361–367.
- Murray P. Rosenthal K. Pfaller M. (2009). *Medical Microbiology*. 6. Mosby Elsevier, PA; USA.
- Myer-Scholl, A., Draeger, A., Luge, E., Ulrich, R., Nockler, K. (2010). Comparison of Two PCR Systems for the Rapid Detection of *Leptospira* spp. From Kidney Tissue. *Current Microbiology*, In press.
- Nally, J. E., Chow, E., Fishbein, M. C., Blanco, D. R. & Lovett, M. A. (2005). Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections. *Infect. Immun.* 73, 3251–3260.

- Nally, J. E., J. P. Whitelegge, S. Bassilian, D. R. Blanco, and M. A. Lovett. (2007). Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. *Infect. Immun.* 75:766–773.
- Naranjo M. (2010). Evaluación microbiológica de cepas autóctonas de *L. interrogans* serogrupo Ballum como candidato vacunal contra la leptospirosis. (Tesis). Cuba.
- Nascimento A, Ko AI, Martins EAL, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, et al. (2004). Comparative genomics of *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J Bacteriol*; 186: 2164-72.
- Natarajaseenivasan K, Vijarachari, S; Sugunan, A; sehgal, C. (2005). Phenotypic and genotypic conservation of ompL1 and ompL41 among leptospiral isolates of Andaman Island. *Indian J Med Res.*; 122: 343-347.
- NTC 4132. Microbiología. Guía general para el recuento de Mohos y Levaduras. Técnica de Recuento de Colonias a 25°C.
- NTC 4225. Microbiología de Alimentos y de Alimentos para animales. Método Horizontal para la detección de *Listeria monocytogenes*.
- NTC 4458. Microbiología de Alimentos y de Alimentos para animales. Método Horizontal para el recuento de coliformes o *Escherichia coli* o ambos. Técnica de recuento de colonias utilizando métodos fluorogénicos o cromogénicos.
- NTC 4574. Microbiología de Alimentos y de Alimentos para animales. Método Horizontal para la detección de *Salmonella spp*.
- NTC 4779. Microbiología de Alimentos y de Alimentos para animales. Método Horizontal para el recuento de Estafilococos coagulasa positivo (*Staphylococcus aureus* y otras especies)
- NTC 5476. Determinación del contenido de humedad. Método de Karl Fisher.
- OIE. Office International des Epizooties. (2008). Leptospirosis. En: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Chapter 2.1.9. 251-264 pp.
- Oliveira, A. A. M. R.A.; Pereira, G.C.; Langoni, H.; Souza, M.I.; Navegantes, W.A.; SA, M.E. (2001). Seroprevalence of bovine leptospirosis in Garanhuns Municipal
- OMS (2008). Leptospirosis Humana: Guía Para el Diagnóstico, Vigilancia y Control.

- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (1987). Leptospirosis. Manual de Métodos para el Diagnóstico de Laboratorio. Nota técnica. 30: 46.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2008). Leptospirosis. En Capítulo 1.1.9. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animal. 251p.
- Palaniappan R V., Chang Y F., Chang Cf., Pan M J., Yang C w., et al. (2005). Evaluation of *Lig*-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospirosis. *Mol cell Probes* 19: 111-117.
- Palaniappan R, Ramanujam S, Chang Y. (2007). Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis*; 20(3):284–292. [PubMed: 17471039].
- Palaniappan RU, Chang YF, Jusuf SS, et al. (2002). Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. *Infect Immune*; 70: 5924-30.
- Palmer M F., Zochowski W J. (2000). Survival of leptospires in commercial blood culture systems revisited, *J. Clin Pathol*, 53: 713-714.
- Panesar, P., J. Kennedy, D. Gandhi and K. Bunko. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry* 105: 1-14.
- Plank R, Dean D. (2000). Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes Infect*; 2(10):1265–1276. [PubMed: 11008116].
- Putnam, F.W. (1960). *The Plasma Proteins*. Vol. I, 1a. Edic. Academic Press, New York,; 16-128.
- Qin JH, Sheng Y , Zhang ZM, Shi YZ, He P, Hu BY, Yang Y, Liu SG, Zhao GP, Guo ZK (2006) Genome-wide transcriptional analysis of temperature shift in *Leptospira interrogans* serovar lai strain 56601. *Microbiology* 6:51.
- Rahelinirina S., Leon A., Hartskeerl R A., Sertour N., Ahmed A., Raharimanana C., Ferquel E., Garnier M., Chartier L., Duplantier J., Rahalison L., Cornet M. (2010). First isolation and direct evidence for the existence of large small-mammal reservoirs of *Leptospira* sp. In Madagascar. *PloS ONE* 5(11): e14111.doi:10.1371/ journal.
- Ralaiarijaona RL, Bellenger E, Chanteau S, Roger F, Perolat P, *et al.* (2001) [Detection of leptospirosis reservoirs in Madagascar using the polymerase chain reaction technique]. *Arch Inst Pasteur Madagascar* 67: 34–36.
- Ratnam S. A. (1994). Manual on leptospirosis. S.R. Publications: Madras.

- Reed N, Goddard R, Wyeth P. (2000). The Maintenance of Challenge Strains Used in the Potency Test for Canine *Leptospira* Vaccines. *Biological* (28):25-8.
- Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, et al. (2003) Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 422: 888–893.
- Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, et al. (2003). Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*; 422: 888-93.
- *Revista Biomédica* (2001). Oct-Dic., Vol.12 Issue 4, p282, 6p. Base de datos; Medic Latina.
- Ricaldi J. Vinetz J. (2008). Leptospirosis in tropics and in travelers. *Curr Infect Dis Rep*. January; 8(1):51-58.
- Ristow, P. *et al.* (2007). The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathog.* 3, e97. The first identification of a virulence determinant according to Koch's molecular postulates.
- Rodríguez Alonso, Gomez Hector, Cruz de Paz Raul. (2000). Leptospirosis Humana: ¿Un problema de Salud? *Rev. Cubana Salud Pública* 26(1):27 – 34.
- Rodríguez I, Obregón AM, Rodríguez J, Fernández C, Arzola A, Victoria B. (2002). Caracterización serológica de cepas aisladas de pacientes con leptospirosis humana en Cuba. *Rev Cubana Hig Epidemiology* 40: 11-5.
- Rodríguez, T., Pulido, C. (2010). *Determinación de la curva de cinética de seis cepas de referencia de Leptospira spp.* Trabajo de pregrado no publicado. Facultad de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Colegio Mayor de Cundinamarca.
- Russell F, Beyt and Russell C. Johnson (1978). Protein – Free and Low-Protein. Media for the cultivation of *Leptospira*. *American Society for Microbiology*. Vol 19, No 2. P 562-569.
- Sánchez E., Gutiérrez B., Fernández C., Arias J. (2007). Producción y evaluación serológica de una bacteria contra leptospirosis bovina. *Rev. MVZ. Córdoba*. Vol. 12. No 2.
- Schmittgen TD (2000) Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem* 285:194–204.
- Schneiderman, A., M. R. Green, L. E. McClure, and M. S. Dunn. (1953). Nutrition of *Leptospira Canicola*. HI. Utilization of vitamins and amino acids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 82:53-56.

- Segura, E. R. et al. (2005). Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. *Clin. Infect. Dis.* 40, 343–351.
- Seixas F K., et al. (2007). Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the Lip L32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamster from challenge vaccine. 26, 88-95.
- Shang ES, Summers TA, Haake DA.(1996). Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect. Immune*; 64:2322–2330. [PubMed: 8675344].
- Shenberg Esther. (1967). Growth of Pathogenic *Leptospira* in Chemically Defined Media. *J Bacteriol.* May; 93(5):1598–1606.
- Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD (2006). Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiol* 6: 95.
- Smibert, R. M. (1977). LEPTOSPIROSIS 323 *InA.* I. Laskin and Vol. 14. *The Spirochaetales*, p. 195–228
- Smythe LD, Smith IL, Smith GA, Dohnt MF, Symonds ML, Barnett LJ, McKay DB (2002) A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *Infect Dis* 2:1–7
- Seixas, F. K. et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. *Vaccine* 26, 88–95 (2007).
- Staneck, J. L., R. C. Henneberry, and C. D. Cox. (1973). Growth requirements of pathogenic *Leptospira*. *Infect. Immun.* 7:886-897.
- Sterling, C. R. & Thiermann, A. B. (1981). Urban rats as chronic carriers of leptospirosis: an ultrastructural investigation. *Vet. Pathol.* 18, 628–637.
- Stimson, A. M. (1907). Note on an organism found in yellow-fever tissue. *Public Health Rep.* 22:541.
- Stuart, R. D. (1946) *J. Path. Bact.*, 58, 343.
- Sturzenbaum SR, Kille P (2001) Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. *Comp Biochem Physiology* 130:281–289
- Sullivan N.D., (1974). Leptospirosis in animals and man. *Aus.Vet.J.* 50, 216-223.
- Sykes J.E., Hartmann K., Lunn K.F., Moore G.E., Stoddard R.A., and Goldstein R.E. (2010). 2010 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention. This

interesting study suggests that differential expression of LPS O antigen influences the ability of the pathogen to cause an acute lethal infection versus chronic renal carriage.

- Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Chierakul W, Smythe L, Petkanchanapong W, Limpaboon R, et al. (2007). A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. *PLoS Neglected Trop Dis*; 1:50-56.
- Thomas, D. D. & Higbie, L. M. (1990). In vitro association of leptospires with host cells. *Infect. Immune*. 58, 581–585.
- Torres L D. Ortiz D. Rodríguez J L. Patiño R. (2008). Comparación de tres tratamientos para la criopreservación de serovares de *Leptospira* en nitrógeno líquido. *Revista corpoica- Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 9(2), 72-76.
- Trevejo R T, Rigan-Perez Y, Ashford DA, et al (1998). Epidemic Leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage, Nicaragua 1995. *Infect Dis* 178, 1457-1463.
- Truccolo, J., Serais, O., Merien, F. & Perolat, P. (2001). Following the course of human leptospirosis: evidence of a critical threshold for the vital prognosis using a quantitative PCR assay. *FEMS Microbiol. Lett.* 204, 17–321.
- Trueba, G., Zapata, S., Madrid, K., Cullen, P. & Haake, D. (2004). Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int. Microbiol.* 7, 35–40.
- Tucunduva de Faria M., Athanazio D A., Goncalves E A., Silva E F., Reis M G., Ko A I. (2007). Morphological alterations in the kidney of rats with natural and experimental *Leptospira* infection. *J. Comp. Pathol.* 137: 231-238.
- Vadillo S (2002). Manual de microbiología veterinaria. Editorial M.C. Graw Hill, pp. 246 – 252.
- Vanasco, N. B., G. Sequeira, M. L. D. Fontana, S. Fusco, M. D. Sequeira, and D. Enria. (2000). Descripción de un brote de leptospirosis en la ciudad de Santa Fe, Argentina, marzo–abril de 1998. *Rev. Panam. Salud Pública.* 7:35–40.
- Vedhagiri, K., Natarajaseenivasan, K., Chellapandi, P., Prabhakaran, S.G., Selvin, J., Sharma, S. y Vijayachari, P. (2009). Evolutionary implication of outer membrane lipoprotein-encoding genes *ompL1* and *lipL41* of pathogenic *Leptospira* species. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 7(3), 96-106.



- Veloso, IF, Lopez, MTP. Salas, CE. Moreira, EC. (2000). A comparison of three DNA. Extractive Procedures with *Leptospira* for Polymerase Chain Reaction Analysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 95 (3): 339-343.
- Verma A, Hellwage J, Artiushin S, Zipfel PF, Kraiczy P, Timoney JF, Stevenson B. (2006). LfhA, a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. *Infect. Immune*; 74:2659–2666. [PubMed: 16622202].
- Vervoort, H. (1922) *Geneesk. T. Ned.-Ind.*, 62, 697.
- Vieira M L., Pimenta D., Morais Z M., Vasconcellos G., Nascimento A. (2009). Proteome analysis of *Leptospira interrogans* virulent strain. *The open Microbiology Journal*; 3, 69-74.
- Vieira ML, De Moráis ZM, González AP, Romero EC, Vasconcelos SA, Nascimento AL. Lsa63. (2010). A newly identified surface protein of *Leptospira interrogans* binds laminin and collagen IV. *J Infect* (1):52–64. [PubMed: 19879894].
- Villanueva S Y., Ezoe H., Baterna R A., Yanagihara Y., Muto M., Koizumi N., Fukui T., Okamoto Y., Mazuzawa T., Cavinta L., Gloriani N G., Yoshida S. (2010). Serologic and molecular studies of *Leptospira* and leptospirosis among rats in the Philippines *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82(5). Pg. 889-898.
- Villegas G. (2004). *Tecnología Quesera*. Editorial Trillas. México. ISBN 968-24-6999-6.
- Vip DE, Amato Neto V, Duarte MS. (1992). The early diagnosis of Leptospirosis by demonstrating antigens via an immunohistochemical exam of the hamstring muscle. *Rev. Inst. Med. Trop Sao Paulo* 34 (5): 375-81
- Vivian JP, Beddoe T, McAlister AD, Wilce MC, Zaker-Tabrizi L, Troy S, Byres E, Hoke DE, Cullen PA, Lo M, Murray GL, Adler B, Rossjohn J. Crystal (2009). Structure of LipL32, the most abundant surface protein of pathogenic *Leptospira* spp. *J Mol Biol*; 387:1229–1238. [PubMed: 19236879].
- Vogel, H., Hutner. S. H 1961. Growth of *Leptospira* in defined media. *J. Gen. Microbiol.* 26:223-230.
- Wadsworth, A. (1947). “*Standard Methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health*. E. Williams and Wilkins, Baltimore, 3-415.
- WHO. (2003a). World Health Organization. Who Guidelines on Non-clinical Evaluation of Vaccines.

- WHO-OPS INH “R.R” Venezuela (2001). Guía de Procedimientos Para el Diagnóstico y Control de la Leptospirosis en Venezuela. Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” Ministerio de Salud y Desarrollo Social.
- Wolff, J. W. (1924) (M.D. thesis, Amsterdam University).
- Xue F, Yan J, Picardeau M (2009) Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned from the genomes. *Microbes Infect* 11: 328–333.
- Xue, F., Dong, H., Jinyu, W., Zuowei, W., Weilin, H., Sun, A., Troxell, B., Frank, X., Yang J. (2010). Transcriptional Responses of *Leptospira interrogans* to Host Innate Immunity: Significant Changes in Metabolism, Oxygen Tolerance, and Outer Membrane. *PLoS Negl Trop Dis* 4(10): e857. Doc 10.1371/journal.pntd. 0000857.
- Yan, W; *et al.* (2009). “Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (LigB) in a hamster challenge model”. *Microbes Infect.* 11. 2: 230–237.
- Yang J, Zhang Y, Xu J, Geng Y, Chen X. (2009). Serum Activity of Platelet-Activating Factor Acetyl hydrolase is a Potential Clinical Marker for Leptospirosis Pulmonary Hemorrhage. *PLoS ONE*; 4(1):4176-4181.
- Yang, Chih-Wei CW; Wu, Mai-Szu MS; Pan, Ming-Jeng MJ; Hsieh, Wang-Ju WJ; Vandewalle, Alain A; *et al.* (2002). The *Leptospira* outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. *Journal* 13. 8 August: 2037-2045.
- Zaki SR, WV Shieh and epidemic warking group. (1996). Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary hemorrhage, Nicaragua. 1995. *Lancet* 347: 553.
- Zhang X; *et al.* (2005). “Expression and comparative analysis of genes encoding outer membrane proteins LipL21, LipL32 and OmpL1 in epidemic leptospires”. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* (Shanghai). 37. 10:649–656.
- Zuerner RL, Alt D, Bolin CA (1995) IS1533-based PCR assay for identification of *Leptospira interrogans* sensu lato serovars. *J Clin Microbiol* 33: 3284–3289.

# **ANEXOS**

**EVALUACIÓN  
FÍSICO-QUÍMICA**

**SUPLEMENTOS:**

**MODIFICADO Y CONVENCIONAL**

## Anexo 1. PROCEDIMIENTO MÉTODO BIURET SUPLEMENTO MODIFICADO Y CONVENCIONAL.



## EXPRESIÓN Y CÁLCULO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE BIURET DEL SUPLEMENTO MODIFICADO Y CONVENCIONAL.

### SUPLEMENTO MODIFICADO

Espectrofotómetro: Génesys.

Longitud de onda: 540 nm.

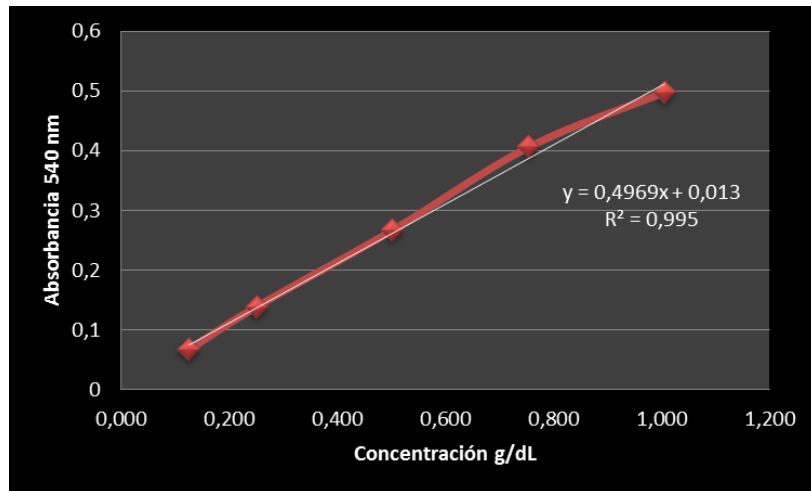
$$\text{Patrón de Albúmina} = \frac{0.5030 \text{ g Albúmina}}{50 \text{ mL de dilución}} \times \frac{100 \text{ mL}}{1 \text{ dL}} = \frac{1.006 \text{ g Albúmina}}{\text{dL}}$$

**Tabla. PROTOCOLO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BIURET.**

TUBOS	REACTIVOS			RESULTADOS				
	PATRÓN DE PROTEÍNA $\mu\text{L}$	AGUA $\mu\text{L}$	R.BIURET (mL)	ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN g/dL	%PROTEÍNA	PROMEDIO	Desviación Estándar
Blanco	0	1000	1	0				
1	125	875	1	0.067	0.125			
2	250	750	1	0.139	0.250			
3	500	500	1	0.267	0.500			
4	750	250	1	0.406	0.750			
5	1000	0	1	0.498	1.000			
	<b>MUESTRAS</b>							
*M1	1000 $\mu\text{L}$	0	1	0.226	0.4287	0.83%		
*M2	1000 $\mu\text{L}$	0	1	0.232	0.4407	0.88%		
*M3	1000 $\mu\text{L}$	0	1	0.215	0.4065	0.81%		
*M4	1000 $\mu\text{L}$	0	1	0.231	0.4387	0.88%	0.85%	0.03

\*M1, M2, M3, M4: Suplemento Modificado.

## REPRESENTACIÓN CURVA DE CALIBRACIÓN



## EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Teniendo en cuenta los pesos de las muestras y los factores de dilución, se calcula el contenido de las proteínas en las diferentes muestras, en g/dL y el porcentaje en peso. Los cálculos para la determinación del porcentaje de proteína fueron los siguientes:

### CÁLCULO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE PROTEÍNA.

$$\% \text{ PROTEINA} = \frac{\frac{\text{Concentración muestra g}}{\text{dL}} \times \frac{1 \text{ dL}}{100 \text{ mL}} \times \text{Dilución} \times 1 \text{ mL muestra}}{\text{Peso de la muestra (g)}} \times 100$$

### CÁLCULOS PARA EL SUPLEMENTO MODIFICADO

$$\% \text{ PROTEINA} = \frac{0,4287 \text{ g/dL} \times 1 \text{ dL}/100 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}/0,5 \text{ mL} \times 1 \text{ mL muestra}}{1,0274 \text{ g}} = 0,83\%$$

$$\% \text{ PROTEINA} = \frac{0.4407 \text{ g/dL} \times 1 \text{ dL}/100 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}/0.5 \text{ mL} \times 1 \text{ mL muestra}}{1.0024 \text{ g}} = 0.88\%$$

$$\% \text{ PROTEINA} = \frac{0.4065 \text{ g/dL} \times 1 \text{ dL}/100 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}/0.5 \text{ mL} \times 1 \text{ mL muestra}}{1.0007 \text{ g}} = 0.81\%$$

$$\% \text{ PROTEINA} = \frac{0.4387 \text{ g/dL} \times 1 \text{ dL}/100 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}/0.5 \text{ mL} \times 1 \text{ mL muestra}}{1.0033 \text{ g}} = 0.87\%$$

El promedio para el porcentaje de proteína del suplemento modificado fue de 0.85% y una desviación estándar de 0.03

## EXPRESIÓN Y CÁLCULO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO BIURET

### SUPLEMENTO CONVENCIONAL

Espectrofotómetro: Génesys.

Longitud de onda: 540 nm.

$$\text{Patrón de Albúmina:} = \frac{1.0041 \text{ g Albúmina}}{100 \text{ mL}} \times \frac{100 \text{ mL}}{\text{dL}} = 1.0041 \text{ g / dL.}$$

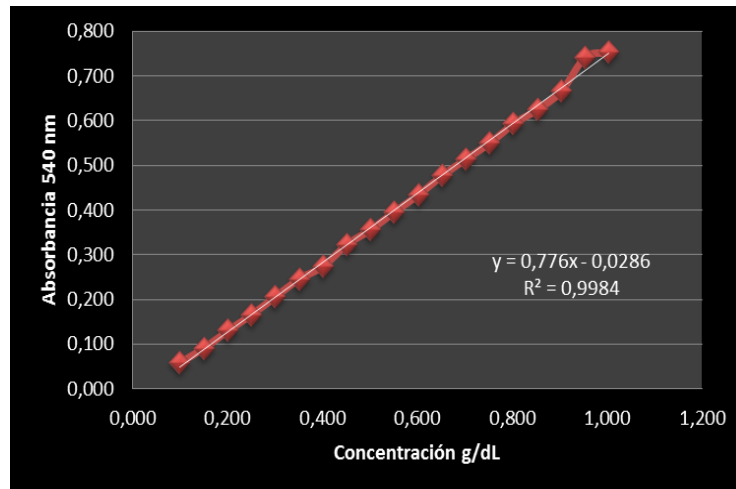
### Tabla PROTOCOLO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BIURET.

TUBOS	REACTIVOS			ABSORBANCIA	RESULTADOS			
	PATRÓN DE PROTEÍNA μL	AGUA μL	R.BIURET (mL)		CONCENTRACIÓN g/dL	%PROTEÍNA	PROMEDIO	Desviación Estándar
Blanco	0	1000	1					
1	100	900	1	0.059	0.100			
2	150	850	1	0.091	0.151			
3	200	800	1	0.130	0.201			
4	250	750	1	0.166	0.251			
5	300	700	1	0.206	0.301			
6	350	650	1	0.246	0.351			
7	400	600	1	0.274	0.402			
8	450	550	1	0.323	0.452			
9	500	500	1	0.356	0.502			
10	550	450	1	0.396	0.552			
11	600	400	1	0.434	0.602			
12	650	350	1	0.477	0.653			
13	700	300	1	0.514	0.703			
14	750	250	1	0.550	0.753			
15	800	200	1	0.593	0.803			
16	850	150	1	0.625	0.853			
17	900	100	1	0.666	0.904			
18	950	50	1	0.742	0.954			
19	1000	0	1	0.752	1.004			
	MUESTRAS							
*M1	1000	0	1	0.041	0.0897	9.0		
*M2	1000	0	1	0.047	0.0974	9.5		
*M3	1000	0	1	0.045	0.0948	9.3	9.3%	0.3

\*M1, M2, M3 = Suplemento convencional.



## REPRESENTACIÓN CURVA DE CALIBRACIÓN



## CALCULO PARA EL SUPLEMENTO CONVENCIONAL

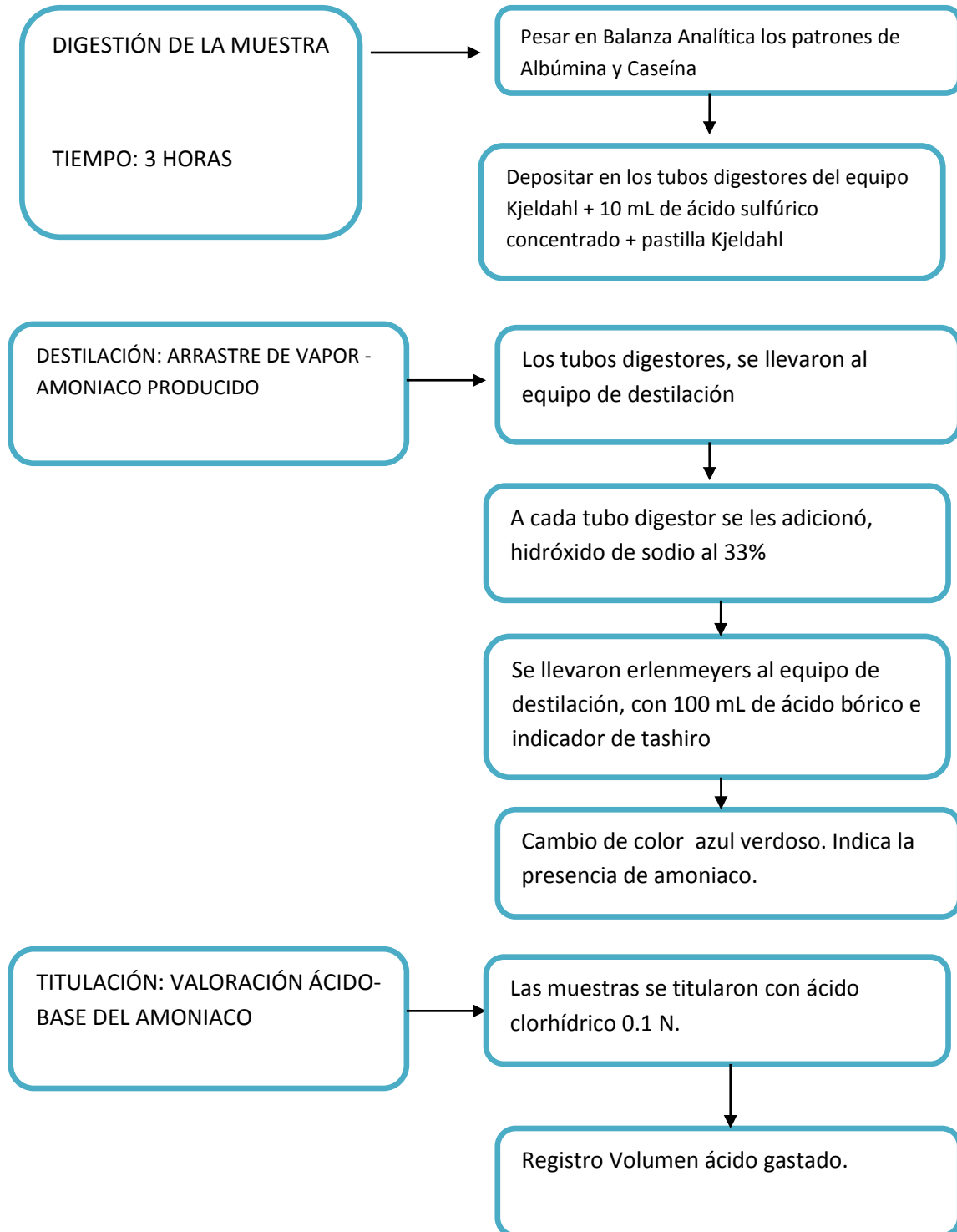
$$\% \text{ PROTEINA} = \frac{0.0897 \text{ g/dL} \times 1 \text{ dL}/100 \text{ mL} \times 100 \text{ mL}/1 \text{ mL} \times 1 \text{ mL muestra}}{1.0006 \text{ g}} = 9.0\%$$

$$\% \text{ PROTEINA} = \frac{0.0974 \text{ g/dL} \times 1 \text{ dL}/100 \text{ mL} \times 100 \text{ mL}/1 \text{ mL} \times 1 \text{ mL muestra}}{1.0232 \text{ g}} = 9.5\%$$

$$\% \text{ PROTEINA} = \frac{0.0948 \text{ g/dL} \times 1 \text{ dL}/100 \text{ mL} \times 100 \text{ mL}/1 \text{ mL} \times 1 \text{ mL muestra}}{1.0156 \text{ g}} = 9.3\%$$

El promedio del porcentaje de proteína para el suplemento comercial fue de 9.3% y la desviación estándar fue de 0.3.

## Anexo 2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL Y COMPUESTOS NITROGENADOS, MÉTODO KJELDAHL DEL SUPLEMENTO MODIFICADO Y CONVENCIONAL.



**EXPRESIÓN Y CÁLCULO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE PROTEÍNA TOTAL Y COMPUESTOS NITROGENADOS POR EL MÉTODO KJELDAHL DEL SUPLEMENTO MODIFICADO Y SUPLEMENTO CONVENCIONAL.**

**Tabla DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE PROTEÍNA DEL SUPLEMENTO MODIFICADO**

	PESO (g)	VOLUMEN DE HCl 0.116 N GASTADO mL	Vol (mL) HCl 0.116N gastado – Vol (mL) HCl Blanco	PORCENTAJE DE PROTEÍNA	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTANDAR
Blanco		0.28				
Patrón de albúmina	0.1047	9.55				
Patrón de caseína	0.0557	5.73				
<b>SUPLEMENTO MODIFICADO</b>						
*M1	5.0006	4.31	4.03	0.8179		
*M2	5.0003	4.30	4.02	0.8160		
*M3	5.0010	4.05	4.05	0.8219	0.82%	0.003

\*M1,\* M2, \*M3 = Suplemento modificado.

**FORMULA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE PROTEÍNA**

$$\% \text{ Proteína} = (V_{\text{HCl}} * N_{\text{HCl}} * 14 * 6.25 * 100) / (\text{Peso Muestra} * 1000)$$

**DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN DE HCl 0.116 N Y HCl 0.1232 N.**

Se obtiene restando el volumen de ácido clorhídrico gastado del patrón con el volumen gastado de ácido clorhídrico del blanco. Como se muestra a continuación:

**PATRÓN DE CASEÍNA**

**A.** Determinación del volumen de HCl 0.116 N para el patrón de proteína:  
5.73 mL - 0.28 mL = 5.45 mL

$$\% \text{ Proteína} = (5.73 \text{ mL} * 0.116 \text{ N} * 14 * 6.25 * 100) / (0.0557 \text{ g} * 1000) = 99.3 \%$$

**Tabla. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE PROTEÍNA DEL SUPLEMENTO CONVENCIONAL.**

	PESO (g)	VOLUMEN DE HCl 0.1232 N GASTADO mL	Vol (mL) HCl 0.1232N gastado – Vol (mL) HCl Blanco	PORCENTAJE DE PROTEÍNA	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTANDAR
Blanco		0.28				
Patrón de caseína	0.1071	9.06				
<b>SUPLEMENTO CONVENCIONAL</b>						
*M4	1.0279	8.79	8.51	8.9248		
*M5	1.0273	8.84	8.56	8.9824		
*M6	1.0275	8.82	8.54	8.9597	8.96%	0.03

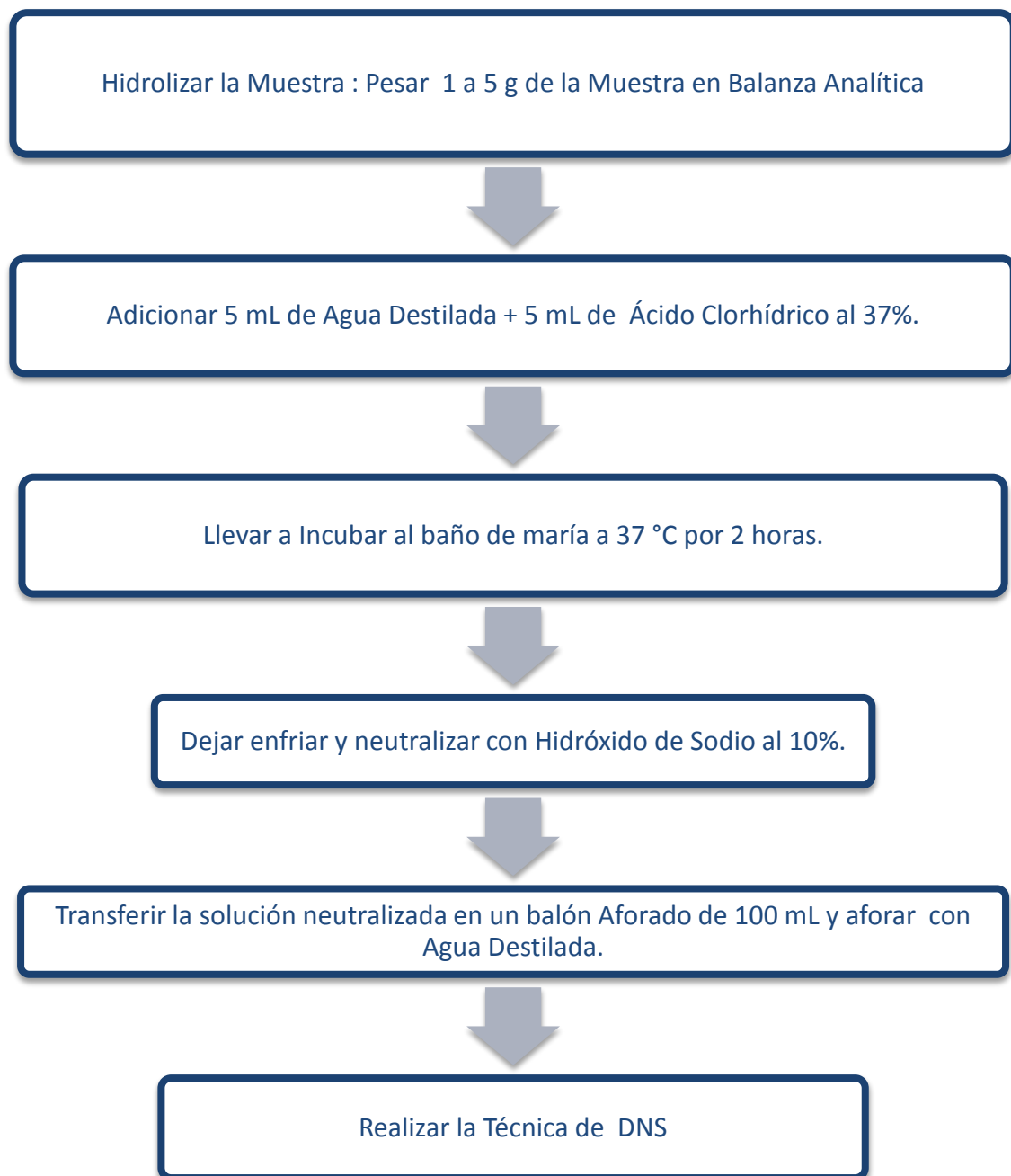
\*M4, \*M5, \*M6 = Suplemento convencional.

**B.** Determinación del volumen de HCl 0.1232N para el patrón de proteína:

$$9.06 \text{ mL} - 0.28 \text{ mL} = 8.78 \text{ mL}$$

$$\% \text{ Proteína} = (8.78 \text{ mL} \cdot 0.1232 \cdot 14 \cdot 6.25 \cdot 100) / (0.1071 \text{ g} \cdot 1000) = 88.4 \%$$

**Anexo 3. PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES TOTALES Y REDUCTORES DEL SUPLEMENTO MODIFICADO Y CONVENCIONAL.**



## EXPRESIÓN Y CÁLCULO PARA LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES TOTALES DEL SUPLEMENTO MODIFICADO Y CONVENCIONAL.

### SUPLEMENTO MODIFICADO

#### CURVA DE CALIBRACIÓN

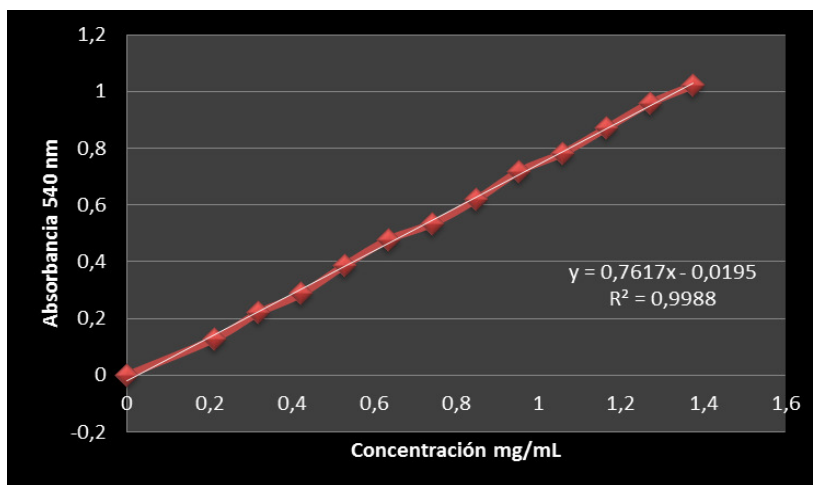
**PATRÓN DE GLUCOSA:** 0.1059 g de Glucosa Anhidra

Conversión a mg / mL:  $\frac{0.1059 \text{ g Glucosa}}{50 \text{ mL Solución}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} = 2.118 \text{ mg / mL}$

#### TABLA. DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN.

TUBOS	PATRÓN DE GLUCOSA $\mu\text{L}$	AGUA $\mu\text{L}$	ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN mg/mL
Blanco	0	1000	0	0
1	100	900	0.128	0.2118
2	150	850	0.219	0.3177
3	200	800	0.287	0.4236
4	250	750	0.388	0.5295
5	300	700	0.478	0.6354
6	350	650	0.534	0.7413
7	400	600	0.618	0.8472
8	450	550	0.719	0.9531
9	500	500	0.783	1.0590
10	550	450	0.871	1.1649
11	600	400	0.959	1.2708
12	650	350	1.022	1.3767

#### REPRESENTACIÓN CURVA DE CALIBRACIÓN



## EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Teniendo en cuenta los pesos de las muestras y los factores de dilución, se calcula el contenido de azúcares totales en g de azúcares totales por 100 g de muestra.

## CÁLCULO PARA LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES TOTALES Y REDUCTORES

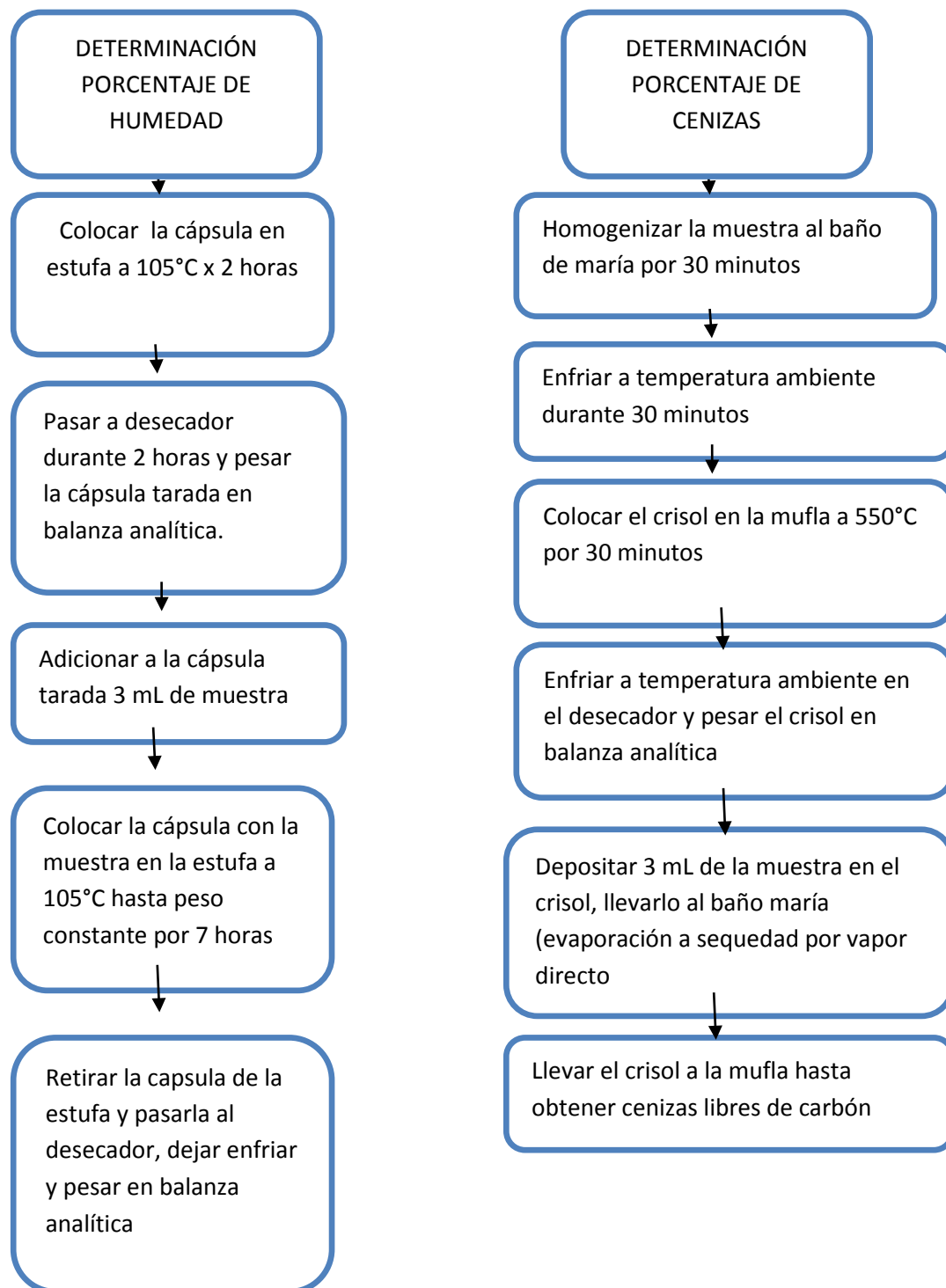
$$\% \text{ Azúcares Totales y/o Reductores} = \frac{\frac{\text{Concentración muestra g}}{\text{mL de solución}} \times \text{Dilución} \times 1 \text{ mL muestra}}{\text{Peso de la muestra (g)}} \times 100$$

## TABLA. PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES TOTALES Y REDUCTORES.

	Muestras	% Azúcares totales (mg/mL)	Promedio % Azúcares totales (mg/mL)	% Azúcares reductores (mg/mL)	Promedio % Azúcares reductores (mg/mL)
Suplemento modificado	1	3.63	3.60 +/- 0.03	1.73	1.72 +/- 0.01
	2	3.60		1.72	
	3	3.56		1.70	
Suplemento convencional	1	0.47	0.48 +/- 0.01	0.10	0.11 +/- 0.01
	2	0.48		0.10	
	3	0.48		0.12	

El promedio de azúcares totales y reductores para el suplemento modificado fue de 3.60% y 1.72%, con una desviación estándar de 0.03 y 0.01 respectivamente, mientras que para el suplemento convencional fue de 0.48% y 0.11% con una desviación estándar de 0.01.

**Anexo 4. PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD Y CENIZAS DEL SUPLEMENTO MODIFICADO Y CONVENCIONAL.**





**EXPRESIÓN Y CÁLCULO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DEL SUPLEMENTO MODIFICADO Y CONVENCIONAL.**

**TABLA. VALORES EXPERIMENTALES EN LA DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD.**

MUESTRA	PESO CÁPSULA VACÍO (g) P <sub>1</sub> TARADO	PESO CÁPSULA + MUESTRA ANTES DE LA ESTUFA (g) P <sub>2</sub>	PESO CÁPSULA + MUESTRA DESPUÉS DE LA ESTUFA (g) P <sub>3</sub>	% HUMEDAD	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
<b>SUPLEMENTO MODIFICADO</b>						
*M1	39.1213	41.4102	39.2531	94.2418		
*M2	39.1910	41.4121	39.3176	94.3001		
*M3	39.1012	42.4003	39.2839	94.4621	94.3%	0.1
<b>SUPLEMENTO CONVENCIONAL</b>						
*M4	52.8433	55.7825	53.1678	88.95		
*M5	52.8405	55.7836	53.1631	89.039		
*M6	52.8411	55.7821	53.1595	89.17	89.1%	0.1

\*M1, \*M2, \*M3 = Suplemento modificado. \*M4, \*M5, \*M6 = Suplemento convencional.

**CÁLCULOS: %HUMEDAD = g humedad / masa de muestra (g) X 100**

**g humedad = P<sub>3</sub> - P<sub>1</sub>**

**Masa de muestra = P<sub>2</sub> - P<sub>1</sub>**

$$\% \text{ HUMEDAD} = \frac{P_3 - P_1}{P_2 - P_1} \times 100$$

**EXPRESIÓN Y CÁLCULO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE CENIZAS DEL SUPLEMENTO MODIFICADO Y CONVENCIONAL.**

**TABLA. VALORES EXPERIMENTALES EN LA DETERMINACION DE CENIZAS**

MUESTRA	PESO CRISOL VACÍO (g) P <sub>1</sub> TARADO	PESO CRISOL + MUESTRA ANTES DE LA ESTUFA (g) P <sub>2</sub>	PESO CRISOL + MUESTRA DESPUÉS DE LA ESTUFA (g) P <sub>3</sub>	% CENIZAS	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
<b>SUPLEMENTO MODIFICADO</b>						
*M1	20.9204	25.9126	20.9387	0.3666		
*M2	20.9238	25.9208	20.9435	0.3942		
*M3	20.9216	25.9243	20.9392	0.3518	0.37%	0.02
<b>SUPLEMENTO CONVENCIONAL</b>						
*M4	23.3758	32.9872	28.3829	0.1539		
*M5	28.3746	32.9532	28.3825	0.1725		
*M6	28.3697	32.9612	28.3784	0.1895	0.17%	0.02

\*M1, \*M2, \*M3 = Suplemento modificado. \*M4, \*M5, \*M6 = Suplemento convencional.

**CÁLCULOS**    %CENIZAS= g cenizas / masa de muestra (g) X 100

$$\text{g cenizas} = P_3 - P_1$$

$$\text{Masa de muestra} = P_2 - P_1$$

$$\% \text{ CENIZAS} = \frac{P_3 - P_1}{P_2 - P_1} \times 100$$

## Anexo 5. PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE GRASA DEL SUPLEMENTO MODIFICADO Y CONVENCIONAL.



## EXPRESIÓN Y CÁLCULO PARA LA DETERMINACIÓN PORCENTAJE DE GRASA- MÉTODO GERBER (BUTIROMETRICO) DEL SUPLEMENTO MODIFICADO

La Figura 1 muestra el porcentaje de grasa del Suplemento modificado, que fue de 0.6% p/v.



Figura 1. Porcentaje de Grasa. Fuente: Planta Piloto. Zootecnia. Universidad de La Salle-Norte, 2010

## EXPRESIÓN Y CÁLCULO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE GRASA POR EL MÉTODO GERBER (BUTIROMETRICO) DEL SUPLEMENTO CONVENCIONAL.

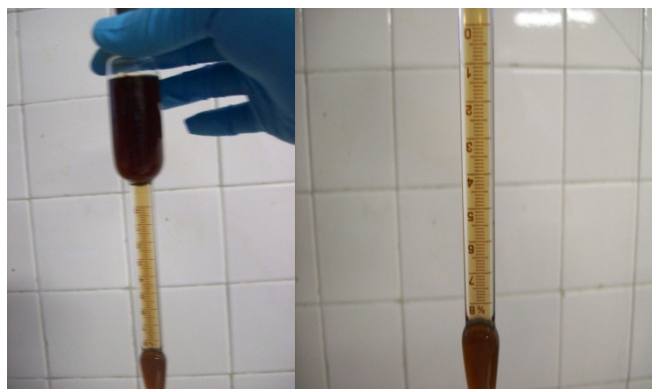


Figura 2. Porcentaje de Grasa. La muestra del suplemento comercial por el método gerber, determinó que no tenía grasa. Fuente: Planta Piloto. Zootecnia. Universidad de La Salle-Norte, 2010

## Anexo 6. Resultados estadísticos para las pruebas químicas del suplemento convencional y modificado.

### PROTEÍNAS BIURET

#### Estadísticos de muestras relacionadas

		Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1	ProtConv	9,2667	3	,25166	,14530
	ProtMod	,8400	3	,03606	,02082

#### Prueba de muestras relacionadas

		Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	ProtConv - ProtMod	8,42667	,23159	,13371	7,85137	9,00196	63,023	2	,000

Se observan diferencias estadísticamente significativas  $p= 0,000$  entre las proteínas determinadas por Biuret para el suplemento convencional y modificado.

### PROTEINA KJELDHAL

#### Estadísticos de muestras relacionadas

		Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1	ProtKConv	8,955633	3	,0290145	,0167516
	ProtKMod	,818600	3	,0030116	,0017388

#### Prueba de muestras relacionadas

		Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	ProtKConv - ProtKMod	8,1370333	,0297574	,0171804	8,0631118	8,2109548	473,622	2	,000

Se observan diferencias estadísticamente significativas  $p= 0,000$  entre las proteínas determinadas por Kjeldahl para el suplemento convencional y modificado.

## HUMEDAD

### Estadísticos de muestras relacionadas

		Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1	HumedCon	89,053000	3	,1106662	,0638931
	HumedMod	94,334667	3	,1141454	,0659019

### Prueba de muestras relacionadas

		Diferencias relacionadas				t	gl	Sig. (bilateral)	
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior				Superior
Par 1	HumedCon - HumedMod	-5,28167	,0178119	,0102837	-5,32591	-5,23742	-513,596	2	,000

Se observan diferencias estadísticamente significativas  $p= 0,000$  entre los resultados de humedad para el suplemento convencional y el modificado.

## CENIZAS

### Estadísticos de muestras relacionadas

		Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1	CenizCon	,171967	3	,0178060	,0102803
	CenizMod	,370867	3	,0215196	,0124243

### Prueba de muestras relacionadas

		Diferencias relacionadas				t	gl	Sig. (bilateral)	
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior				Superior
Par 1	CenizCon - CenizMod	-,1989000	,0320144	,0184835	-,2784281	-,1193719	-10,761	2	,009

Se observan diferencias estadísticamente significativas  $p= 0,009$  entre los resultados de cenizas para el suplemento convencional y el modificado.

## AZUCARES TOTALES

### Estadísticos de muestras relacionadas

		Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1	AzucToCon	,476667	3	,0057735	,0033333
	AzucToMod	3,596667	3	,0351188	,0202759

### Prueba de muestras relacionadas

		Diferencias relacionadas				t	gl	Sig. (bilateral)	
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior				Superior
Par 1	AzucToCon - AzucToMod	-3,12000	,0400000	,0230940	-3,21937	-3,02063	-135,100	2	,000

Se observan diferencias estadísticamente significativas  $p= 0,000$  entre los resultados de azúcares totales para el suplemento convencional y el modificado.

## AZUCARES REDUCTORES

### Estadísticos de muestras relacionadas

		Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1	AzucRedConv	,106667	3	,0115470	,0066667
	AzucRedMod	1,716667	3	,0152753	,0088192

### Prueba de muestras relacionadas

		Diferencias relacionadas				t	gl	Sig. (bilateral)	
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior				Superior
Par 1	AzucRedConv - AzucRedMod	-1,61000	,0264575	,0152753	-1,67572	-1,54428	-105,399	2	,000

Se observan diferencias estadísticamente significativas  $p= 0,000$  entre los resultados de azúcares reductores para el suplemento convencional y el modificado.

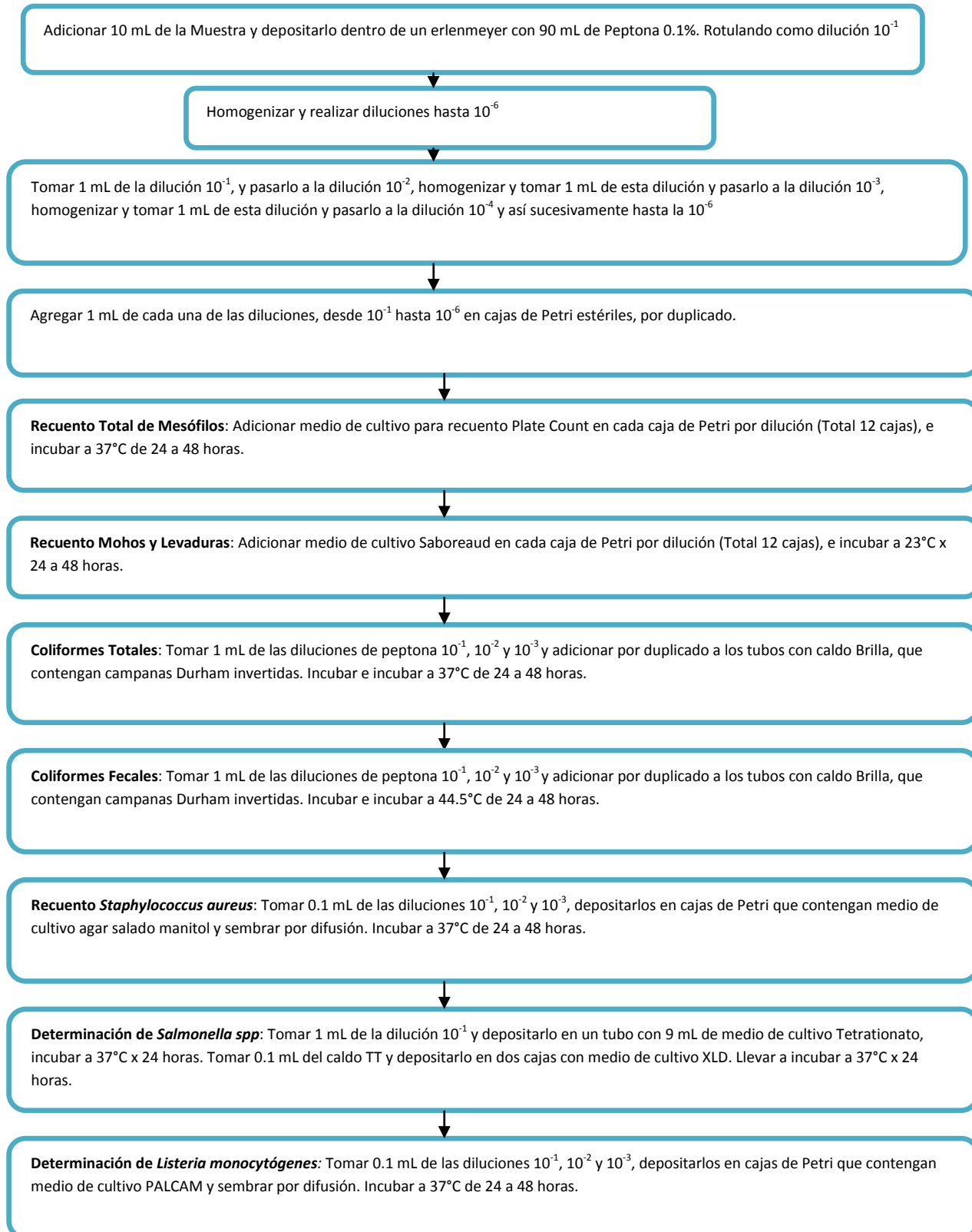
**EVALUACIÓN  
MICROBIOLÓGICA**

**SUPLEMENTOS:**

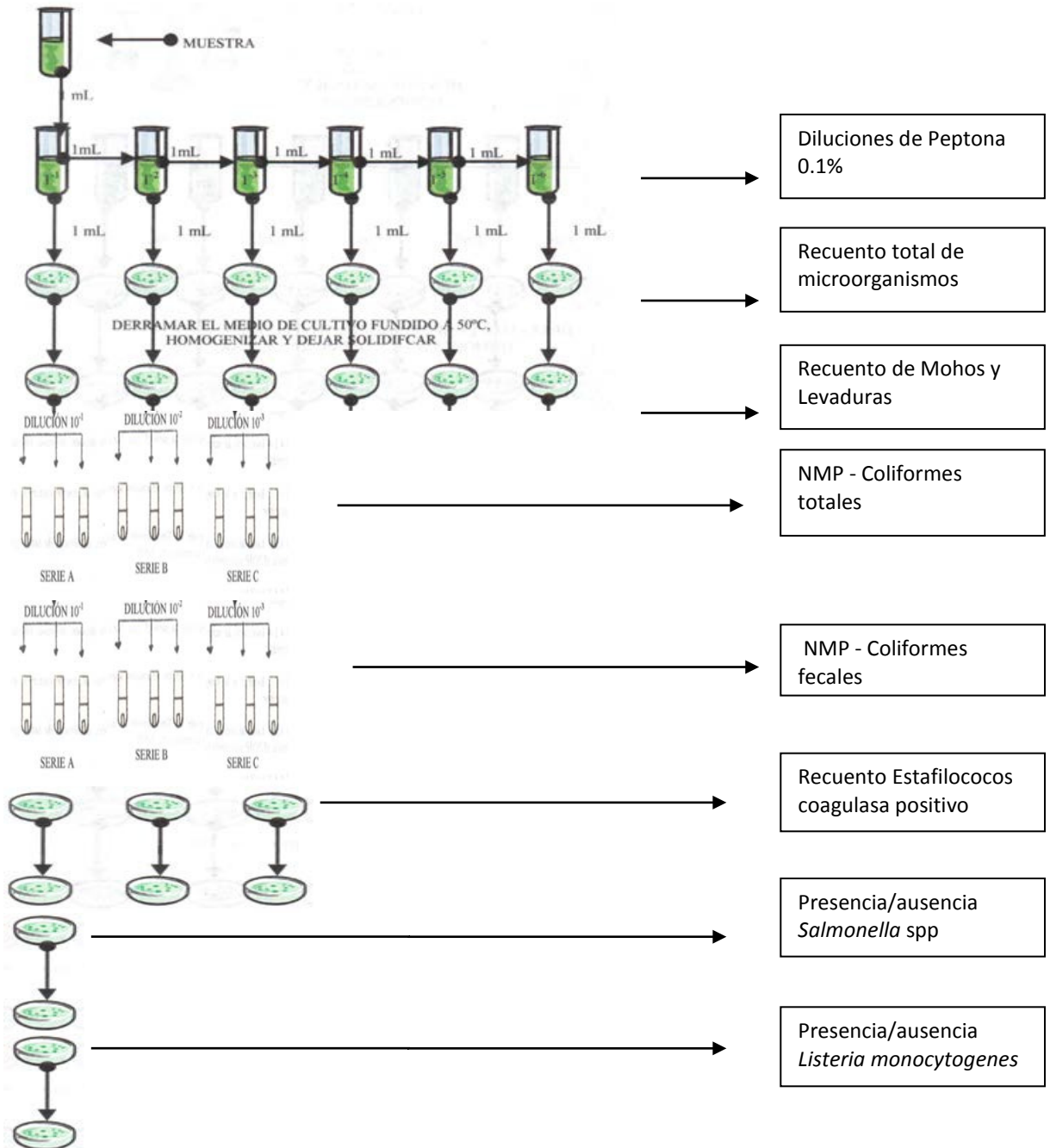
**MODIFICADO Y CONVENCIONAL**



## Anexo 7. PROCEDIMIENTO PARA LA EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL SUPLEMENTO MODIFICADO Y CONVENCIONAL.



**Anexo 8. PROCEDIMIENTO PREPARACIÓN DE DILUCIONES E INOCULACION EN MEDIOS DE CULTIVO PARA RECUESTO MICROBIANO DEL SUPLEMENTO MODIFICADO Y CONVENCIONAL.**



Fuente: (Adaptado) Desilvestri J, 2002

## EXPRESIÓN Y CÁLCULO PARA EL RECUESTO MICROBIANO

El recuento microbiano se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{U.F.C/ g ó mL} = \text{Colonias contadas} \times \text{factor de dilución} \times \text{alícuota}$$

**Donde:**

Colonias contadas = Es el promedio de colonias contadas en dos o más cajas de Petri de la dilución correspondiente.

Factor de Dilución= 1/valor de la dilución.

Factor de Alícuota = 1/ Alícuota inoculada.

### Recuento total de microorganismos mesófilos



Figura 4. U.F.C/ mL de (m.a.v) y M y L <10. Suplemento modificado

### Recuento de Hongos y Levaduras

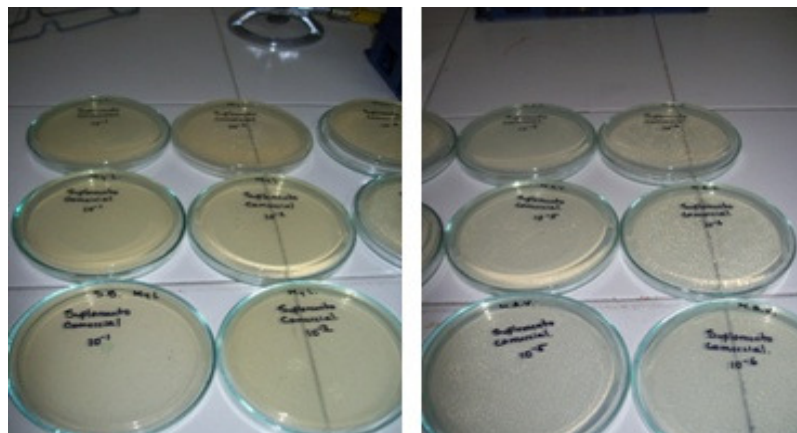


Figura 5. U.F.C/ mL de (m.a.v) y M y L <10. Suplemento convencional.

## Determinación Recuento de Estafilococo coagulasa positivo

Los resultados obtenidos fueron de U.F.C = < 10.



Figura 6. Recuento de Estafilococos coagulasa positivo (*S. aureus*). U.F.C < 10, para el Suplemento convencional y modificado.

Por último, los resultados para el crecimiento de *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes*, fueron negativos reportándose como ausentes en ambos suplementos.

## Anexo 9. DETERMINACIÓN NÚMERO MAS PROBABLE (NMP) COLIFORMES TOTALES Y FECALES

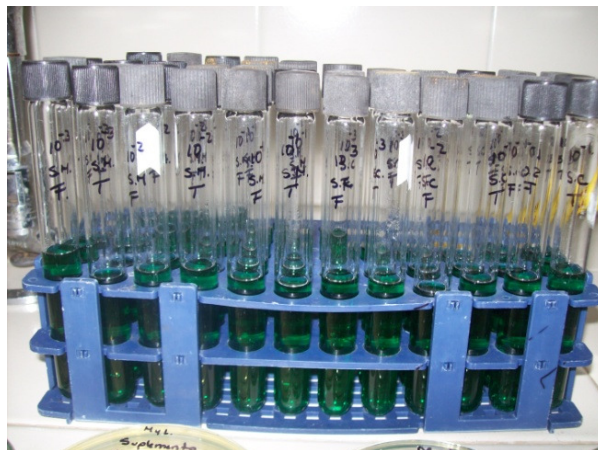


Figura 7. NMP = < 10, para el Suplemento convencional y modificado

### EXPRESIÓN Y CÁLCULO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE

La fórmula para calcular el NMP (NÚMERO MÁS PROBABLE) es la siguiente:

$$\text{NMP / g ó mL} = \frac{\text{Número de tubos positivos}}{\sqrt{\text{mL o g de muestra negativos} \times \text{mL o g de muestra en todos los tubos}}}$$

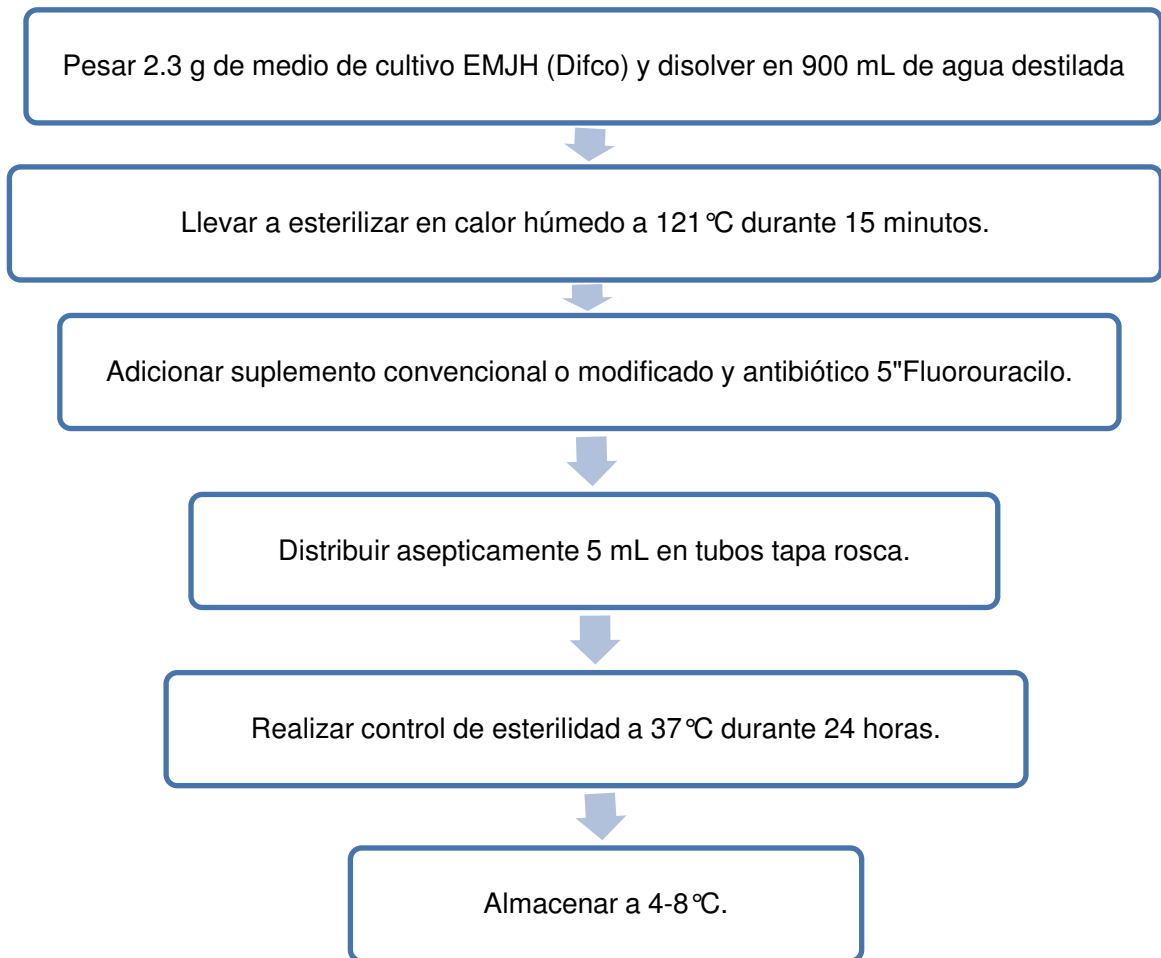
## VALORES DE NMP/ g ó mL

Determinación del NMP, según la inoculación realizada de las distintas diluciones en sus respectivas series, como se muestra en la siguiente tabla

NÚMERO DE TUBOS POSITIVOS EN LA DILUCIÓN 10 <sup>-1</sup>	NÚMERO DE TUBOS POSITIVOS EN LA DILUCIÓN 10 <sup>-2</sup>	NÚMERO DE TUBOS POSITIVOS EN LA DILUCIÓN 10 <sup>-3</sup>	NMP
0	0	0	<3
0	0	1	3
0	1	0	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	> o = 2400

Fuente: Mossel, 2002

## Anexo 10. Procedimiento preparación medio de cultivo EMJH.



## **Anexo 11. Estudio Piloto para la estandarización del protocolo de extracción de RNA bacteriano, Retrotranscripción, PCR convencional y PCR en Tiempo Real**

Se realizó un estudio piloto para la estandarización del proceso de extracción del RNA bacteriano debido a los problemas reportados en estudios previos del grupo de investigación BIOMIGEN de la Universidad de La Salle (Baquero, 2010).

### **Objetivos**

- Determinar el protocolo de mantenimiento para mejorar la calidad del RNA bacteriano.
- Estandarizar los protocolos para la extracción de RNA bacteriano, la Retrotranscripción, la PCR convencional y la PCR en Tiempo Real.

### **Metodología**

**a. Extracción de RNA bacteriano:** Se tomaron seis muestras de 1 mL a partir del mismo cultivo bacteriano en el cual se había comprobado previamente el crecimiento de la bacteria mediante observación directa por campo oscuro. Para la extracción del RNA bacteriano se utilizó el kit de extracción ZR Fungal/Bacterial RNA MicroPrep (Zymo Research®). La extracción se realizó a partir de 1 mL de cultivo líquido de la bacteria obtenido de los puntos previamente seleccionados. Estas muestras fueron sometidas a tres diferentes protocolos de extracción y conservación como se describe a continuación:

Protocolo 1: 2 muestras fueron extraídas de forma directa con el kit previamente citado siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

Protocolo 2: 2 muestras fueron obtenidas y almacenadas de forma rápida a -70°C. A estas muestras se les realizó la extracción de RNA dos días después del almacenamiento.




Protocolo 3.2 muestras fueron obtenidas, conservadas en glicerol (1:1) y almacenadas a -70°C. A estas muestras también se les realizó extracción dos días después.

En el estudio también se incluyó una cepa de *Salmonella* spp como control del proceso. Posterior a la extracción se realizó la Retrotranscripción del RNA bacteriano (RT) para la obtención de cDNA y la PCR del gen *lipL32* de acuerdo con el protocolo descrito en un estudio previo (Baquero, 2010). Los productos amplificados mezclados con 3 µL de azul de bromofenol fueron sembrados en un gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador.

**b. PCR convencional y electroforesis:** Una vez se realizó la extracción del RNA bacteriano, las muestras fueron sometidas a RT, PCR y electroforesis con el fin de corroborar la obtención de RNA. La RT, la PCR y la electroforesis se realizaron de acuerdo al procedimiento descrito en un estudio previo (Baquero, 2010).

Anexo 12. Ficha técnica del suplemento convencional.


279510  
6 x 100 mL

 **BD Difco™ Leptospira Enrichment EMJH**


For use with Difco™ *Leptospira* Medium Base EMJH in cultivating *Leptospira*.  
For Laboratory Use


Approximate Formula\* per Liter of Purified Water  
Bovine Albumin, 100 g; Polysorbate 80, 12.5 g;  
Growth Factors, 1.6 g.  
\*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.


BD and BD Logo are trademarks of Becton, Dickinson and Company. Difco is a trademark of Difco Laboratories, subsidiary of Becton, Dickinson and Company.  
Becton, Dickinson and Company  
Sparks, MD 21152 USA



L-000525JAA (0902)

**LOT** 9356197       2011-12-23

  
(17)111223(10)9356197(30)06

  
(01) 3 038290 279510 1

IMPORTADOR BECTON  
DICKINSON COL. LTDA.  
CALLE 20 No 44 - 41 BOS.  
R.S.I.2006RD-0000018

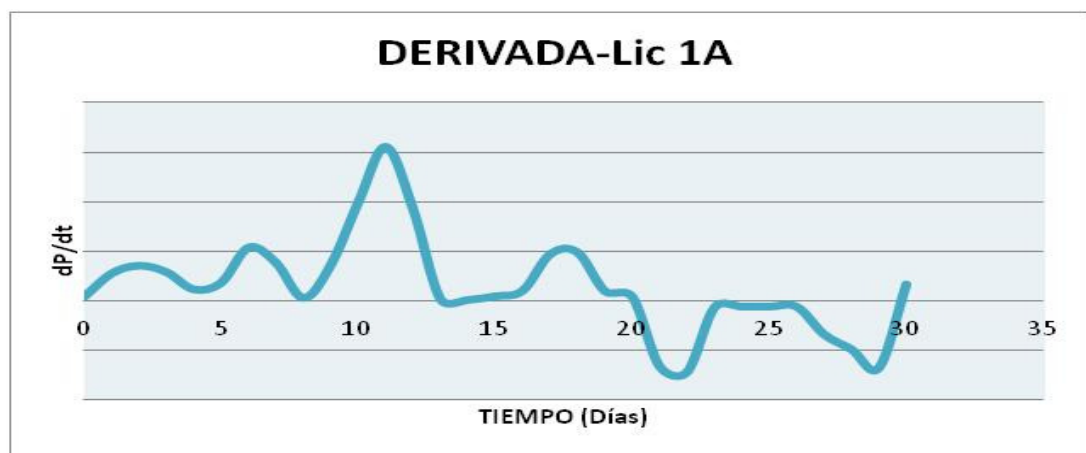
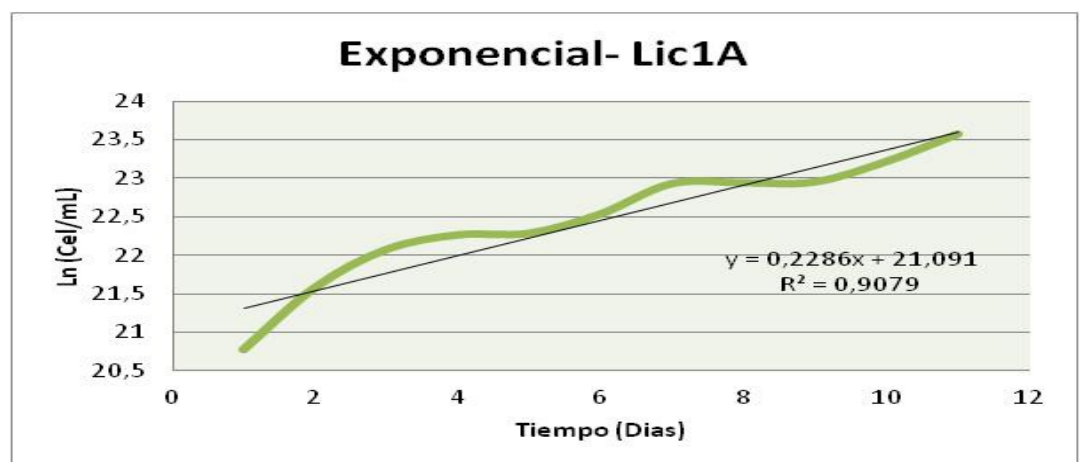
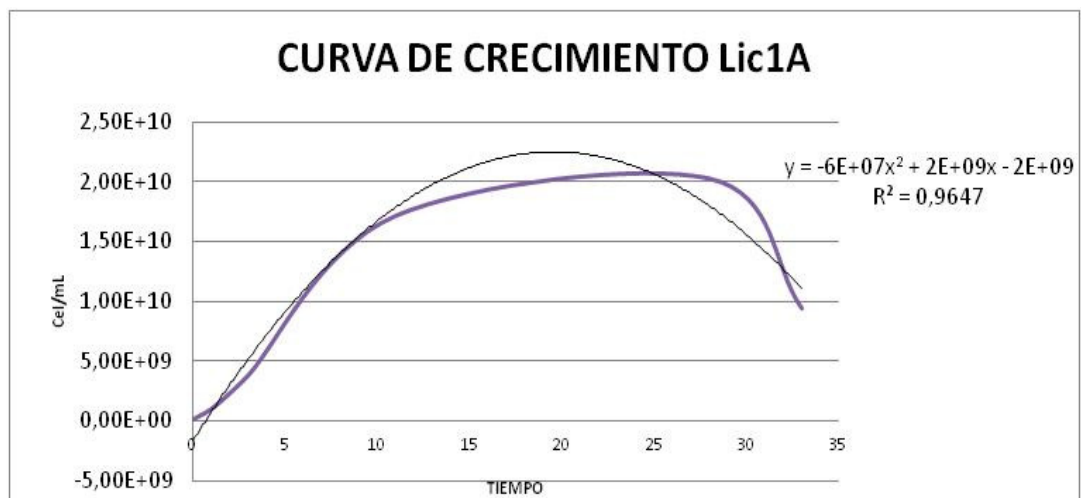
**DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE  
CRECIMIENTO MICROBIANO EN MEDIO DE  
CULTIVO EMJH CON LOS SUPLEMENTOS  
MODIFICADO Y CONVENCIONAL**

## CULTIVO ESTÁTICO

### Anexo 13. CEPA AISLADA – MEDIO DE CULTIVO EMJH CONVENCIONAL. (Lic1A)

Días	Horas	Absorbancia	Cel/mL	Log	Ln
0	0	0,003	1,5E+08	8,17609126	18,8261459
1	24	0,021	1,05E+09	9,0211893	20,772056
2	48	0,047	2,35E+09	9,37106786	21,5776812
3	72	0,077	3,85E+09	9,58546073	22,071339
4	96	0,093	4,65E+09	9,66745295	22,2601331
5	120	0,095	4,75E+09	9,67669361	22,2814105
6	144	0,122	6,1E+09	9,78532984	22,5315546
7	168	0,181	9,05E+09	9,95664858	22,9260306
8	192	0,183	9,15E+09	9,96142109	22,9370197
9	216	0,185	9,25E+09	9,96614173	22,9478894
10	240	0,241	1,21E+10	10,080987	23,2123305
11	264	0,344	1,72E+10	10,2355284	23,5681752
12	288	0,49	2,45E+10	10,3891661	23,921939
13	312	0,492	2,46E+10	10,3909351	23,9260123
14	336	0,492	2,46E+10	10,3909351	23,9260123
15	360	0,493	2,47E+10	10,3918169	23,9280427
16	384	0,499	2,5E+10	10,3970705	23,9401397
17	408	0,509	2,55E+10	10,4056878	23,9599816
18	432	0,574	2,87E+10	10,4578819	24,080163
19	456	0,587	2,94E+10	10,4676081	24,1025584
20	480	0,589	2,95E+10	10,4690853	24,1059597
21	504	0,593	2,97E+10	10,4720247	24,112728
22	528	0,482	2,41E+10	10,382017	23,9054777
23	552	0,477	2,39E+10	10,3774884	23,8950501
24	576	0,471	2,36E+10	10,3719909	23,8823917
25	600	0,467	2,34E+10	10,3682869	23,8738628
26	624	0,461	2,31E+10	10,3626709	23,8609316
27	648	0,457	2,29E+10	10,3588862	23,852217
28	672	0,406	2,03E+10	10,307496	23,7338867
29	696	0,378	1,89E+10	10,2764618	23,6624278
30	720	0,297	1,49E+10	10,1717265	23,4212657
31	744	0,29	1,45E+10	10,161368	23,3974145
32	768	0,292	1,46E+10	10,1643529	23,4042874
33	792	0,189	9,45E+09	9,97543181	22,9692806
34	816	0,196	9,8E+09	9,99122608	23,0056482
35	840	0,194	9,7E+09	9,98677173	22,9953917

## GRÁFICAS cepa aislada medio de cultivo EMJH convencional (Lic1A).



**Cálculo parámetros de crecimiento microbiano para la cepa aislada en el medio de cultivo EMJH convencional (Lic1A) *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae.**

**NÚMERO DE GENERACIONES (FASE EXPONENCIAL):**

	Densidad Poblacional cel / mL	Log cel / mL
Población Final (Nf)	1,72E+10	10,2355284
Población Inicial (No)	1,03E+09	9,0211893

$$n = 3,3 * \text{Log} N_f - \text{log} N_o$$

$$n = 3,3 * (10,2355284 - 9,0211893)$$

$$n = 4.00 \times 10^4 \text{ células / mL.}$$

**VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO**

	Densidad Poblacional En Horas	Densidad Poblacional cel / mL	Ln (Logaritmo natural) Nf y No
Tiempo Final (Tf)	264	1,72E+10	23,5681752
Tiempo Inicial (To)	24	1,03E+09	20,772056

$$\mu = \ln N_f - \ln N_o / (T_f - T_o)$$

$$\mu = (23,5681752 - 20,772056) / (264 - 24)$$

$$\mu = 1.2 \times 10^{-2} \text{ células / h}$$

**CONSTANTE DE VELOCIDAD RELATIVA DE CRECIMIENTO**

$$K = 2.303 * (\log N_f - \log N_o / T_f - T_o)$$

$$K = 2.303 * (10,2355284 - 9,0211893) / (264 - 24)$$

$$K = 1.2 \times 10^{-2} \text{ células / h}$$

**TIEMPO DE DUPLICACIÓN (Td)**

$$T_d = t / n$$

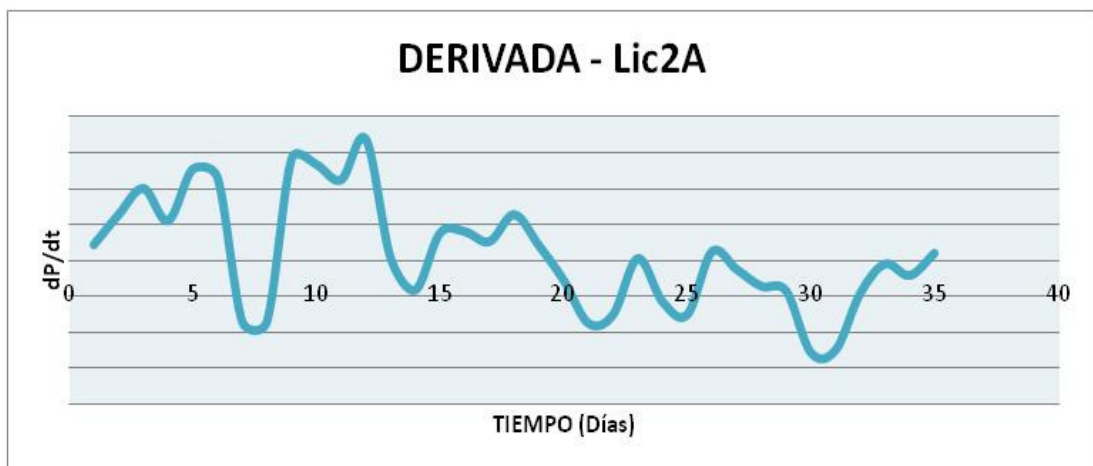
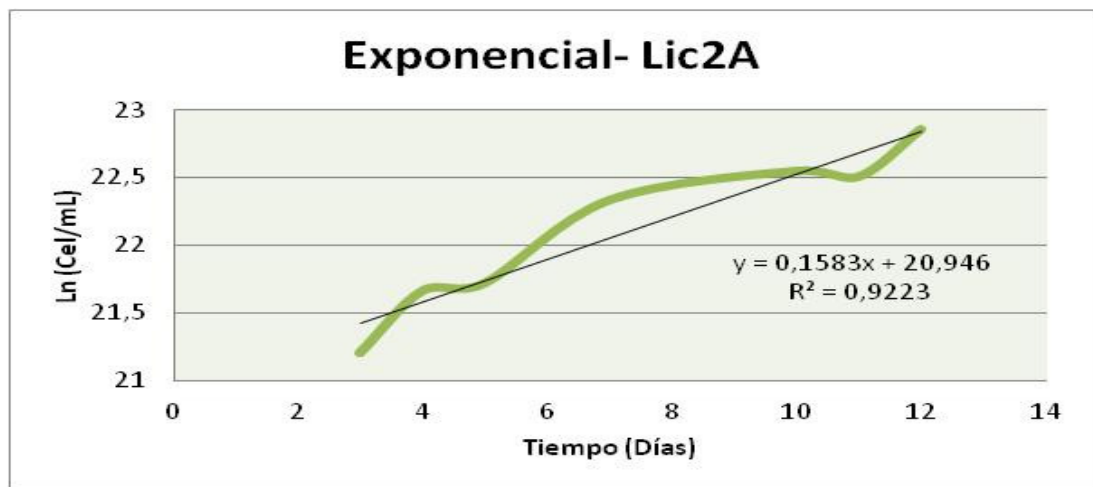
$$T_d = (264 - 24) / 4.00 \times 10^4 \text{ cel / mL}$$

$$T_d = 59.89 \text{ HORAS}$$

**Anexo 14. CEPA CONTROL – MEDIO DE CULTIVO EMJH CONVENCIONAL (Lic2A)**

Días	Horas	Absorbancia	Cel/mL	Log	Ln
0	0	0,007	1,5E+08	8,17609126	18,8261459
1	24	0,017	3,64E+08	8,56144214	19,713449
2	48	0,027	5,79E+08	8,76235698	20,1760726
3	72	0,076	1,63E+09	9,21180681	21,210969
4	96	0,12	2,57E+09	9,41017447	21,6677274
5	120	0,127	2,72E+09	9,43479694	21,7244228
6	144	0,238	5,1E+09	9,70757018	22,3525064
7	168	0,234	5,01E+09	9,70020908	22,3355568
8	192	0,158	3,39E+09	9,52965031	21,9428307
9	216	0,154	3,3E+09	9,51851394	21,9171883
10	240	0,29	6,21E+09	9,79339122	22,5501166
11	264	0,278	5,96E+09	9,77503801	22,5078568
12	288	0,394	8,44E+09	9,92648944	22,8565866
13	312	0,435	9,32E+09	9,96948248	22,9555817
14	336	0,397	8,51E+09	9,92978373	22,864172
15	360	0,396	8,49E+09	9,9286884	22,8616499
16	384	0,432	9,26E+09	9,96647697	22,9486613
17	408	0,433	9,28E+09	9,96748112	22,9509734
18	432	0,456	9,77E+09	9,98995806	23,0027285
19	456	0,492	1,05E+10	10,0229583	23,0787144
20	480	0,475	1,02E+10	10,0076868	23,0435505
21	504	0,466	9,99E+09	9,99937914	23,0244213
22	528	0,393	8,42E+09	9,92538577	22,8540453
23	552	0,395	8,46E+09	9,92759031	22,8591215
24	576	0,395	8,46E+09	9,92759031	22,8591215
25	600	0,341	7,31E+09	9,8637476	22,7121182
26	624	0,324	6,94E+09	9,84153823	22,6609792
27	648	0,352	7,54E+09	9,87753588	22,7438669
28	672	0,312	6,69E+09	9,82514781	22,6232389
29	696	0,318	6,81E+09	9,83342034	22,6422871
30	720	0,272	5,83E+09	9,76556212	22,4860378
31	744	0,198	4,24E+09	9,62765841	22,1685027
32	768	0,155	3,32E+09	9,52132492	21,9236608
33	792	0,155	3,32E+09	9,52132492	21,9236608
34	816	0,150	3,21E+09	9,50708448	21,890871
35	840	0,135	2,89E+09	9,46132699	21,7855105

## GRÁFICAS cepa control medio de cultivo EMJH convencional (Lic2A).





**Cálculo parámetros de crecimiento microbiano para la cepa control en el medio de cultivo EMJH convencional (Lic2A) *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae.**

**NUMERO DE GENERACIONES (FASE EXPONENCIAL):**

	Densidad Poblacional cel / mL	Log cel / mL
Población Final (Nf)	8,443E+09	9,92648944
Población Inicial (No)	1,63E+09	9,21180681

$$n = 3,3 * \text{Log} N_f - \text{log} N_o$$

$$n = 3,3 * (9,92648944 - 9,21180681)$$

$$n = 2.35 \times 10^7 \text{ células/mL.}$$

**VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO**

	Densidad Poblacional En Horas	Densidad Poblacional cel / mL	Ln (Logaritmo natural) Nf y No
Tiempo Final (Tf)	288	8,443E+09	22,8565866
Tiempo Inicial (To)	72	1,63E+09	21,210969

$$\mu = \ln N_f - \ln N_o / (T_f - T_o)$$

$$\mu = (22,8565866 - 21,210969) / (288 - 72)$$

$$\mu = 7.6 \times 10^{-3} \text{ células / h}$$

**CONSTANTE DE VELOCIDAD RELATIVA DE CRECIMIENTO**

$$K = 2.303 * (\log N_f - \log N_o / T_f - T_o)$$

$$K = 2.303 * ((9,92648944 - 9,21180681) / (288 - 72))$$

$$K = 7.6 \times 10^{-3} \text{ células / h}$$

**TIEMPO DE DUPLICACIÓN (Td)**

$$T_d = t / n$$

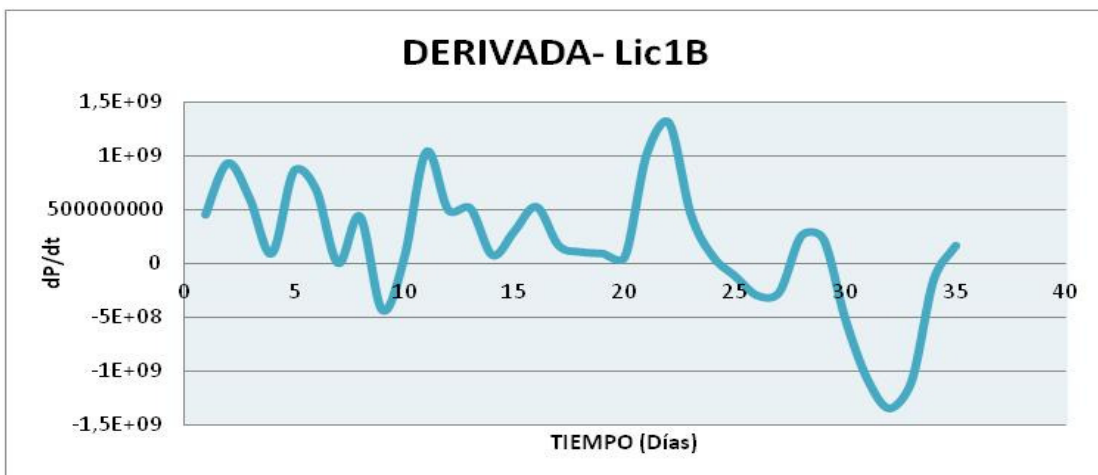
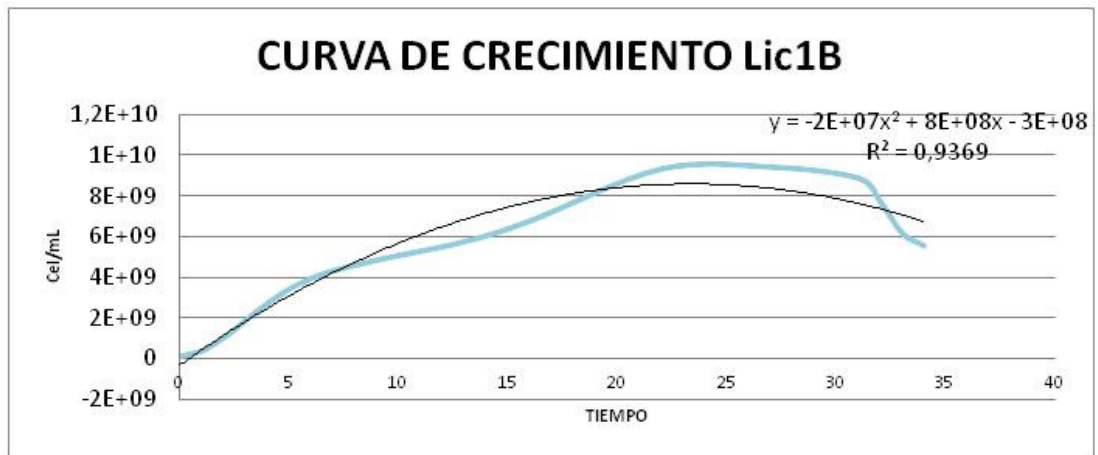
$$T_d = (288 - 72) / 2.35 \times 10^7 \text{ cel / mL}$$

$$T_d = 91.58 \text{ HORAS}$$

**Anexo 15. CEPA AISLADA – MEDIO DE CULTIVO EMJH MODIFICADO (Lic1B)**

Días	Horas	Absorbancia	Cel/mL	Log	Ln
0	0	0,32	1,5E+08	8,17609126	18,8261459
1	24	0,333	1,56E+08	8,19338551	18,8659673
2	48	0,355	1,66E+08	8,22116963	18,9299426
3	72	0,395	1,85E+08	8,26753838	19,0367106
4	96	0,395	1,85E+08	8,26753838	19,0367106
5	120	0,401	1,88E+08	8,27408565	19,0517863
6	144	0,423	1,98E+08	8,29728165	19,105197
7	168	0,447	2,1E+08	8,3212488	19,1603835
8	192	0,452	2,12E+08	8,32607972	19,171507
9	216	0,476	2,23E+08	8,34854823	19,2232427
10	240	0,479	2,25E+08	8,35127679	19,2295255
11	264	0,482	2,26E+08	8,35398832	19,235769
12	288	0,492	2,31E+08	8,36290638	19,2563036
13	312	0,512	2,4E+08	8,38021124	19,2961495
14	336	0,517	2,42E+08	8,38443182	19,3058677
15	360	0,526	2,47E+08	8,39192702	19,3231261
16	384	0,546	2,56E+08	8,40813392	19,3604438
17	408	0,552	2,59E+08	8,41288036	19,3713729
18	432	0,557	2,61E+08	8,41679648	19,3803901
19	456	0,559	2,62E+08	8,41835309	19,3839743
20	480	0,563	2,64E+08	8,42144968	19,3911045
21	504	0,545	2,55E+08	8,40733778	19,3586107
22	528	0,661	3,1E+08	8,49114274	19,5515787
23	552	0,654	3,07E+08	8,48651903	19,5409322
24	576	0,653	3,06E+08	8,48585446	19,539402
25	600	0,651	3,05E+08	8,48452227	19,5363345
26	624	0,65	3,05E+08	8,48385464	19,5347972
27	648	0,65	3,05E+08	8,48385464	19,5347972
28	672	0,635	2,98E+08	8,47371501	19,5114499
29	696	0,634	2,97E+08	8,47303054	19,5098738
30	720	0,489	2,29E+08	8,36025014	19,2501873
31	744	0,435	2,04E+08	8,30943054	19,1331709
32	768	0,428	2,01E+08	8,30238505	19,1169481
33	792	0,393	1,84E+08	8,26533383	19,0316345
34	816	0,352	1,65E+08	8,21748394	18,921456
35	840	0,296	1,39E+08	8,14223299	18,7481843

## GRÁFICAS cepa aislada medio de cultivo EMJH modificado (Lic1B).



**Cálculo parámetros de crecimiento microbiano para la cepa aislada en el medio de cultivo EMJH modificado (Lic1B) *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae.**

**NÚMERO DE GENERACIONES (FASE EXPONENCIAL):**

	Densidad Poblacional cel / mL	Log cel / mL
Población Final (Nf)	3,1E+08	8,49114274
Población Inicial (No)	1,66E+08	8,22116963

$$n=3,3*\text{LogNf}-\text{logNo}$$

$$n= 3,3*(8.49114274 - 8.22116963)$$

$$n= 0.89 \times 10^6 \text{ células / mL.}$$

**VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO**

	Densidad Poblacional En Horas	Densidad Poblacional cel / mL	Ln (Logaritmo natural) Nf y No
Tiempo Final (Tf)	528	3,1E+08	19,5515787
Tiempo Inicial (To)	48	1,66E+08	18,9299426

$$\mu = \ln Nf - \ln No / (Tf - To)$$

$$\mu = (19.5515787 - 18.9299426) / (528 - 48)$$

$$\mu = 1.3 \times 10^{-3} \text{ células / h}$$

**CONSTANTE DE VELOCIDAD RELATIVA DE CRECIMIENTO**

$$K = 2.303* (\text{logNf}- \text{logNo}/ Tf-To)$$

$$K = 2.303* ((9,969882 - 9,021189) / (528 - 48))$$

$$K = 1.3 \times 10^{-3} \text{ células / h}$$

**TIEMPO DE DUPLICACIÓN (Td)**

$$Td = t/n$$

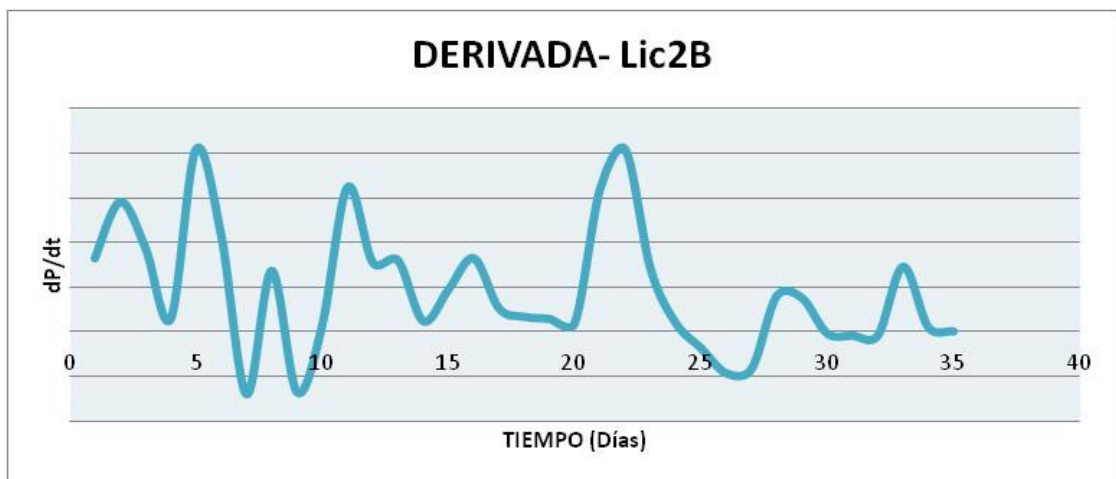
$$Td = (528 - 48) / 0.89 \times 10^6 \text{ cel / mL}$$

$$Td = 538.77 \text{ HORAS}$$

**Anexo 16. CEPA CONTROL – MEDIO DE CULTIVO EMJH MODIFICADO (Lic2B)**

Días	Horas	Absorbancia	Cel/mL	Log	Ln
0	0	0,32	1,5E+08	8,17609126	18,8261459
1	24	0,333	1,56E+08	8,19338551	18,8659673
2	48	0,355	1,66E+08	8,22116963	18,9299426
3	72	0,395	1,85E+08	8,26753838	19,0367106
4	96	0,395	1,85E+08	8,26753838	19,0367106
5	120	0,401	1,88E+08	8,27408565	19,0517863
6	144	0,482	2,26E+08	8,35398832	19,235769
7	168	0,447	2,1E+08	8,3212488	19,1603835
8	192	0,452	2,12E+08	8,32607972	19,171507
9	216	0,476	2,23E+08	8,34854823	19,2232427
10	240	0,423	1,98E+08	8,29728165	19,105197
11	264	0,479	2,25E+08	8,35127679	19,2295255
12	288	0,492	2,31E+08	8,36290638	19,2563036
13	312	0,512	2,4E+08	8,38021124	19,2961495
14	336	0,526	2,47E+08	8,39192702	19,3231261
15	360	0,517	2,42E+08	8,38443182	19,3058677
16	384	0,546	2,56E+08	8,40813392	19,3604438
17	408	0,552	2,59E+08	8,41288036	19,3713729
18	432	0,557	2,61E+08	8,41679648	19,3803901
19	456	0,559	2,62E+08	8,41835309	19,3839743
20	480	0,563	2,64E+08	8,42144968	19,3911045
21	504	0,563	2,64E+08	8,42144968	19,3911045
22	528	0,631	2,96E+08	8,47097064	19,5051307
23	552	0,65	3,05E+08	8,48385464	19,5347972
24	576	0,661	3,1E+08	8,49114274	19,5515787
25	600	0,654	3,07E+08	8,48651903	19,5409322
26	624	0,653	3,06E+08	8,48585446	19,539402
27	648	0,634	2,97E+08	8,47303054	19,5098738
28	672	0,635	2,98E+08	8,47371501	19,5114499
29	696	0,651	3,05E+08	8,48452227	19,5363345
30	720	0,651	3,05E+08	8,48452227	19,5363345
31	744	0,65	3,05E+08	8,48385464	19,5347972
32	768	0,649	3,04E+08	8,48318598	19,5332576
33	792	0,648	3,04E+08	8,48251629	19,5317156
34	816	0,68	3,19E+08	8,50345019	19,5799177
35	840	0,65	3,05E+08	8,48385464	19,5347972

**GRÁFICAS cepa control medio de cultivo EMJH modificado (Lic2B).**



**Cálculo parámetros de crecimiento microbiano para la cepa control en el medio de cultivo EMJH modificado (Lic2B) *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae.**

**NUMERO DE GENERACIONES (FASE EXPONENCIAL):**

	Densidad Poblacional cel / mL	Log cel / mL
Población Final (Nf)	2,96E+08	8,47097064
Población Inicial (No)	1,66E+08	8,22116963

$$n = 3,3 * \text{Log} N_f - \text{log} N_o$$

$$n = 3,3 * (8,47097064 - 8,22010809)$$

$$n = 0.82 \times 10^6 \text{ células / mL.}$$

**VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO**

	Densidad Poblacional En Horas	Densidad Poblacional cel / mL	Ln (Logaritmo natural) Nf y No
Tiempo Final (Tf)	528	2,96E+08	19,5051307
Tiempo Inicial (To)	48	1,66E+08	18,9299426

$$\mu = \ln N_f - \ln N_o / (T_f - T_o)$$

$$\mu = (19,5051307 - 18,9299426) / (528 - 48)$$

$$\mu = 1.2 \times 10^{-3} \text{ células / h}$$

**CONSTANTE DE VELOCIDAD RELATIVA DE CRECIMIENTO**

$$K = 2.303 * (\log N_f - \log N_o / T_f - T_o)$$

$$K = 2.303 * (8,47097064 - 8,22010809) / (528 - 48)$$

$$K = 1.2 \times 10^{-3} \text{ células / h}$$

**TIEMPO DE DUPLICACIÓN (Td)**

$$T_d = t / n$$

$$T_d = (528 - 48) / 0.82 \times 10^6 \text{ cel / mL}$$

$$T_d = 582.28 \text{ HORAS}$$

**Anexo 17. Resultados estadísticos del crecimiento bacteriano en los medios EMJH convencional y modificado bajo condiciones estáticas.**

A partir del plan de análisis se utilizó el programa spss para determinar las medidas de tendencia central en cada uno de los grupos de datos y la relación en los grupos experimentales.

**CULTIVO ESTÁTICO**

T1 → Cepa aislada medio convencional

T2 → Cepa control medio convencional

T3 → Cepa aislada medio modificado

T4 → Cepa control medio modificado

Operaciones múltiples

Ver el resumen de la tabla

	(i) Número	(j) Número	Diferencia media (i,j)	Estatístico	Sig.	Heterogeneidad 95%	
						Límite inferior	Límite superior
H-S de Uney	1	2	108E+0 *	1E+0	.00	7713229	1E+0
		3	134E+0 *	1E+0	.00	134E+0	1E+0
		4	132E+0 *	1E+0	.00	134E+0	1E+0
	2	1	-108E+0 *	1E+0	.00	-108E+0	-7E+0
		3	5763556 *	1E+0	.00	2763328	87E+0
		4	5663556 *	1E+0	.00	2763328	87E+0
	3	1	-130E+0 *	1E+0	.00	-130E+0	-1E+0
		2	-5763556 *	1E+0	.00	-8927088	-27E+0
		4	-2000000	1E+0	1.00	-2974833	31E+0
	4	1	-130E+0 *	1E+0	.00	-130E+0	-1E+0
		2	-5663556 *	1E+0	.00	-8927088	-27E+0
		3	2000000	1E+0	1.00	-2974833	31E+0

Para determinar la existencia de variación entre cada uno de los medios de cultivo y condiciones del cultivo planteadas en el trabajo se realizó el test de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para determinar normalidad y la prueba de Levene para homocedasticidad.



## Pruebas de normalidad

### Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		CelxmL
N		144
Parámetros normales <sup>a,b</sup>	Media	5,8E+09
	Desviación típica	8,3E+09
Diferencias más extremas	Absoluta	,264
	Positiva	,264
	Negativa	-,248
Z de Kolmogorov-Smirnov		3,172
Sig. asintót. (bilateral)		,000

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

$p < 0.05$  Se rechaza la hipótesis y se concluye que los datos no provienen de una distribución normal.

	Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
CelxmL	T1	,196	36	,001	,917	36	,010
	T2	,150	36	,039	,938	36	,046
	T3	,120	36	,200(*)	,950	36	,108
	T4	,191	36	,002	,908	36	,006

$p < 0.05$  Se rechaza la hipótesis y se concluye que los datos no provienen de una distribución normal.

En general, la falta de normalidad de los residuos no tiene gran efecto en el nivel de significancia del test F (La prueba F es estadísticamente robusta).

## Prueba de Homogeneidad

El valor de importancia para la homogeneidad de las diferencias es  $< 0.05$ , por lo que las varianzas de los grupos son significativamente diferentes. Dado que este es un supuesto de análisis de varianza, se fue muy cuidadoso en la interpretación de los resultados de esta prueba:

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
CelxmL	Basándose en la media	116,653	3	140	,000
	Basándose en la mediana.	99,823	3	140	,000
	Basándose en la mediana y con gl corregido	99,823	3	44,657	,000
	Basándose en la media recortada	114,975	3	140	,000

$p < 0.05$  No se cumple el supuesto de homogeneidad de varianza. En este caso se calculó adicionalmente el Test de Welch prueba de comparación de medias que toma en cuenta este problema.

#### ANOVA

CelxmL

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	6453205722 3541600000 00,000	3	2151068574 1180550000 00,000	91,105	,000
Intra-grupos	3305534804 9722200000 00,000	140	2361096289 2658720000 ,000		
Total	9758740527 3263800000 00,000	143			

Este es el resultado de ANOVA principal. El valor de significación comparando los grupos (El crecimiento cel/mL en cada Grupo experimental) es ( $< 0.05$ ), por lo que podría rechazar la hipótesis nula (no hay diferencia en las puntuaciones medias del crecimiento entre los cuatro grupos experimentales). Sin embargo, dado que las varianzas son significativamente diferentes, esto podría ser la respuesta equivocada. Por tal motivo se calculó el Test de Welch y las estadísticas de Brown-Forsythe que permiten utilizar los datos en estas circunstancias:

### Pruebas robustas de igualdad de las medias

CelxmL

	Estadístico <sup>a</sup>	gl1	gl2	Sig.
Welch	78,742	3	70,004	,000
Brown-Forsythe	91,105	3	42,693	,000

a. Distribuidos en F asintóticamente.

El valor de significación de estas pruebas son a la vez <0.05, por lo que todavía se rechaza la hipótesis nula. Sin embargo, este resultado no está indicando que el crecimiento (cel/mL) es responsable de la diferencia, por lo que se requiere el resultado de la prueba post hoc:

### Comparaciones

Verificar los datos

	(i) Nivel de	(j) Nivel de	Diferencia de medias <sup>a</sup>	Error	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	1	2	108E+0 *	1E+0	.00	7713229	14E+0
		3	134E+0 *	1E+0	.00	134E+0	1E+0
		4	132E+0 *	1E+0	.00	134E+0	1E+0
	2	1	-108E+0 *	1E+0	.00	-108E+0	-7E+0
		3	573356 *	1E+0	.00	2733228	87E+0
		4	553356 *	1E+0	.00	2733228	87E+0
	3	1	-134E+0 *	1E+0	.00	-134E+0	-1E+0
		2	-573356 *	1E+0	.00	-892388	-2E+0
		4	-200000	1E+0	1.00	-2973883	31E+0
	4	1	-132E+0 *	1E+0	.00	-132E+0	-1E+0
		2	-553356 *	1E+0	.00	-892388	-2E+0
		3	-200000	1E+0	1.00	-2973883	31E+0
Games-Howell	1	2	108E+0 *	1E+0	.00	69388	1E+0
		3	134E+0 *	1E+0	.00	12E+0	2E+0
		4	132E+0 *	1E+0	.00	12E+0	2E+0
	2	1	-108E+0 *	1E+0	.00	-10E+0	6E+0
		3	573356 *	5E+0	.00	48388	7E+0
		4	553356 *	5E+0	.00	48287	7E+0
	3	1	-134E+0 *	1E+0	.00	-20E+0	-1E+0
		2	-573356 *	5E+0	.00	-70788	4E+0
		4	-200000	1E+0	.30	-52388	1E+0
	4	1	-132E+0 *	1E+0	.00	-20E+0	-1E+0
		2	-553356 *	5E+0	.00	-70788	4E+0
		3	-200000	1E+0	.30	-12388	5E+0

\*. La diferencia es significativa al nivel 0,05

\* La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

La prueba de Tukey se basa en la homogeneidad de la varianza, por lo que se ignoraron estos resultados. La Games-Howell prueba post-hoc no se basa en la homogeneidad de

varianza (es por eso que se utilizó esta prueba post-hoc) y por lo tanto pueden ser utilizados los resultados.

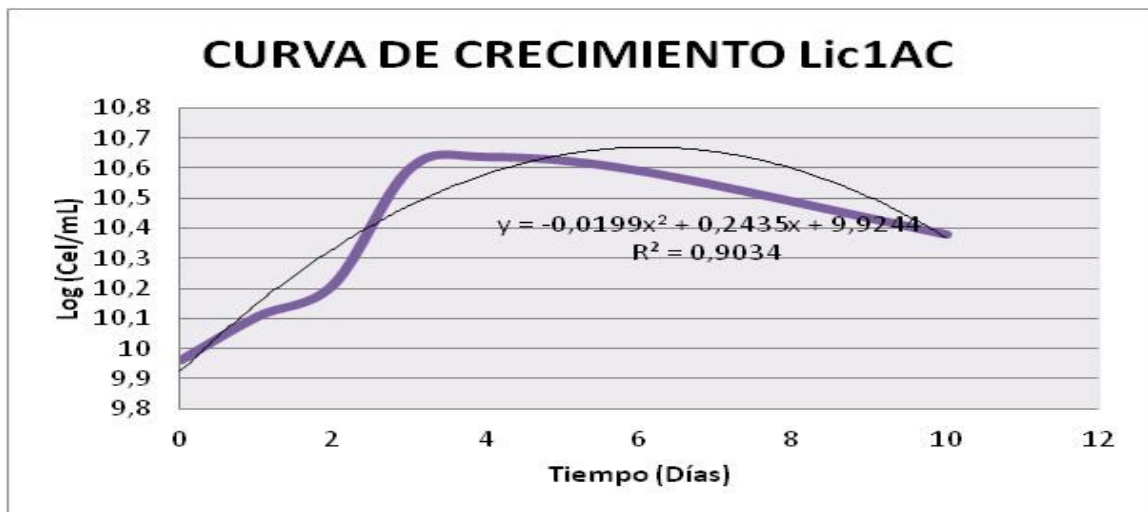
Resultado: Los cuatro modelos experimentales producen resultados significativamente diferentes. Hay una diferencia significativa entre el crecimiento (cel/mL) del medio modificado y el convencional para las dos cepas estudiadas; sin embargo, como se observa en los resultados de la prueba entre el grupo 3 y 4 no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas; lo cual indica que el crecimiento para la cepa aislada y control en el medio modificado fue similar pero se diferenció del convencional.

## CULTIVO AGITADO

### Anexo 18. CEPA AISLADA – MEDIO DE CULTIVO EMJH CONVENCIONAL AGITADO (Lic1AC).

Días	Absorbancia	Cel/mL	Log	Ln
0	0,183	9,15E+09	9,96142109	22,9370197
1	0,256	1,28E+10	10,10721	23,272711
2	0,328	1,64E+10	10,2148438	23,5205472
3	0,799	3,995E+10	10,6015168	24,4108945
4	0,872	4,36E+10	10,6394865	24,498323
5	0,776	3,88E+10	10,5888317	24,3816861
6	0,783	3,915E+10	10,5927318	24,3906663
7	0,49	2,45E+10	10,3891661	23,921939
8	0,527	2,635E+10	10,4207806	23,9947341
9	0,519	2,595E+10	10,4141374	23,9794374
10	0,481	2,405E+10	10,3811151	23,9034008

### GRÁFICAS cepa aislada medio de cultivo EMJH convencional agitado (Lic1AC).





**Cálculo parámetros de crecimiento microbiano para la cepa aislada en el medio de cultivo EMJH convencional agitado (Lic1AC) *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae.**

**NUMERO DE GENERACIONES (FASE EXPONENCIAL):**

	Densidad Poblacional cel / mL	Log cel / mL
Población Final (Nf)	4E+10	10,6015168
Población Inicial (No)	9,15E+09	9,96142109

$$n = 3,3 * \text{Log} N_f - \text{log} N_o$$

$$n = 3,3 * (10,6015168 - 9,96142109)$$

$$n = 2.11 \times 10^6 \text{ células / mL.}$$

## VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO

	Densidad Poblacional En Horas	Densidad Poblacional cel / mL	Ln (Logaritmo natural) Nf y No
Tiempo Final (Tf)	264	4E+10	24,4108945
Tiempo Inicial (To)	240	9,15E+09	22,9370197

$$\mu = \ln N_f - \ln N_o / (T_f - T_o)$$

$$\mu = (24,4108945 - 22,9370197) / (264 - 192)$$

$$\mu = 2.0 \times 10^{-2} \text{ células / h}$$

## CONSTANTE DE VELOCIDAD RELATIVA DE CRECIMIENTO

$$K = 2.303 * (\log N_f - \log N_o / T_f - T_o)$$

$$K = 2.303 * ((10,6015168 - 9,96142109) / (264 - 192))$$

$$K = 2.0 \times 10^{-2} \text{ células / h}$$

## TIEMPO DE DUPLICACIÓN (Td)

$$T_d = t / n$$

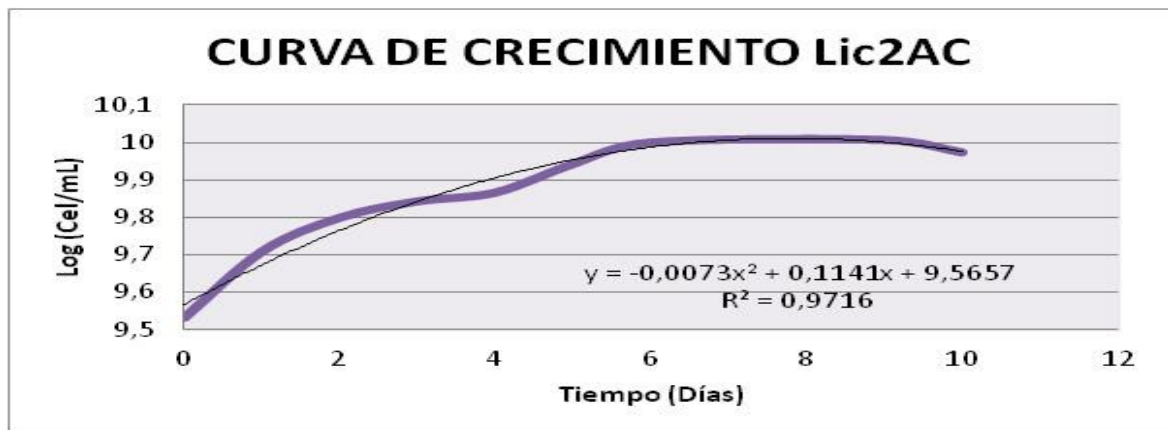
$$T_d = (264 - 192) / 2.36 \text{ cel / mL}$$

$$T_d = 34.08 \text{ HORAS}$$

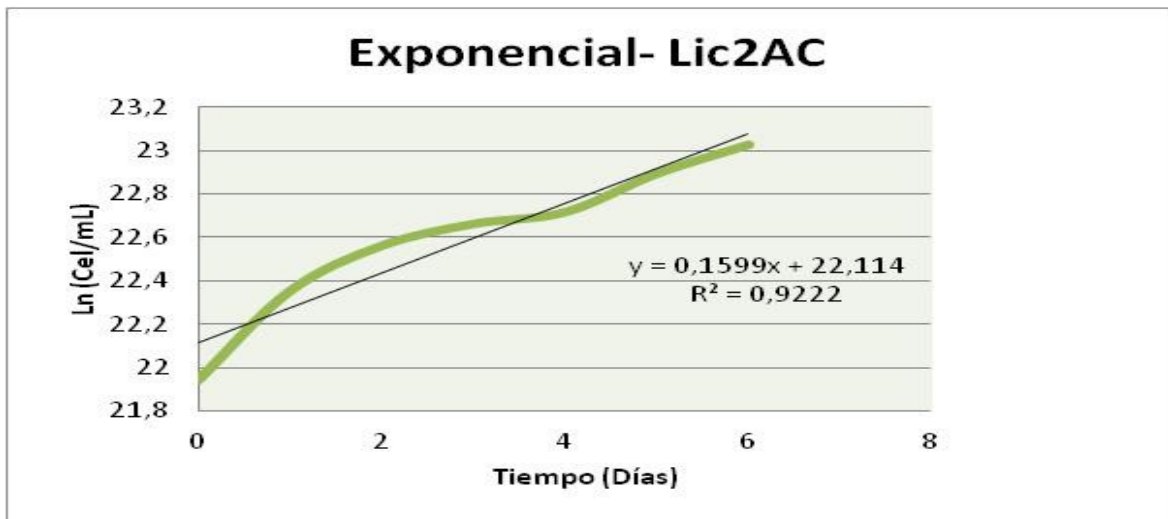
**Anexo 19. CEPA CONTROL – MEDIO DE CULTIVO EMJH CONVENCIONAL  
AGITADO (Lic2AC)**

Día	Absorbancia	Cel/mL	Log	Ln
0	0,158	3,39E+09	9,5302	21,9440958
1	0,238	5,11E+09	9,70812	22,3537714
2	0,293	6,29E+09	9,79841	22,5616733
3	0,324	6,95E+09	9,842088	22,6622442
4	0,342	7,34E+09	9,865569	22,7163115
5	0,408	8,75E+09	9,942203	22,8927679
6	0,63	1,35E+10	10,13088	23,3272205
7	0,874	1,88E+10	10,27305	23,6545811
8	0,814	1,75E+10	10,24217	23,5834611
9	0,473	1,01E+10	10,0064	23,0405961
10	0,438	9,40E+09	9,973017	22,9637196

**GRÁFICAS cepa control medio de cultivo EMJH convencional agitado (Lic2AC).**







**Cálculo parámetros de crecimiento microbiano para la cepa control medio de cultivo EMJH convencional agitado (Lic2AC) *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae.**

**NUMERO DE GENERACIONES (FASE EXPONENCIAL):**

	Densidad Poblacional cel / mL	Log cel / mL
Población Final (Nf)	1,35E+10	10,13088
Población Inicial (No)	3.39E+09	9,5302

$$n = 3,3 * \text{Log} N_f - \text{log} N_o$$

$$n = 3,3 * (10,13088 - 9,5302)$$

$$n = 1.55 \times 10^7 \text{ células / mL.}$$

## VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO

	Densidad Poblacional En Horas	Densidad Poblacional cel / mL	Ln (Logaritmo natural) Nf y No
Tiempo Final (Tf)	336	1,35E+10	23,3272205
Tiempo Inicial (To)	192	3,39E+09	21,9440958

$$\mu = \ln N_f - \ln N_o / (T_f - T_o)$$

$$\mu = (23,3272205 - 21,9440958) / (336 - 192)$$

$$\mu = 7.5 \times 10^{-2} \text{ células / h}$$

## CONSTANTE DE VELOCIDAD RELATIVA DE CRECIMIENTO

$$K = 2.303 * (\log N_f - \log N_o / T_f - T_o)$$

$$K = 2.303 * (9.999929 - 9.5302) / (336 - 192)$$

$$K = 7.5 \times 10^{-2} \text{ células / h}$$

## TIEMPO DE DUPLICACIÓN (Td)

$$T_d = t / n$$

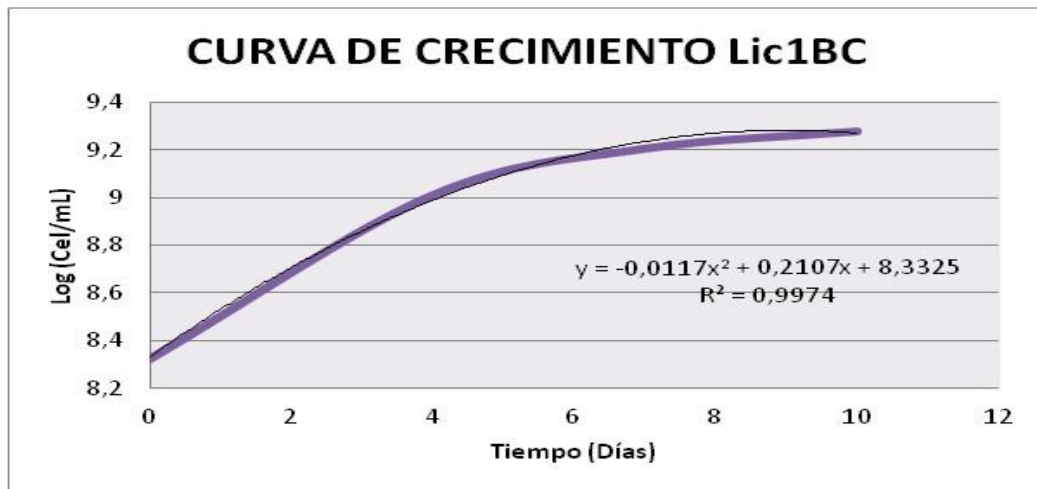
$$T_d = (336 - 192) / 1.98 \text{ cel / mL}$$

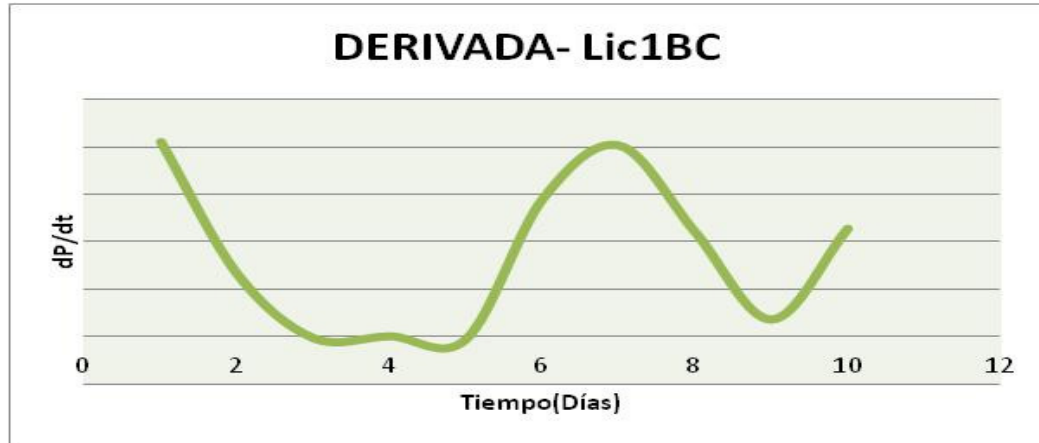
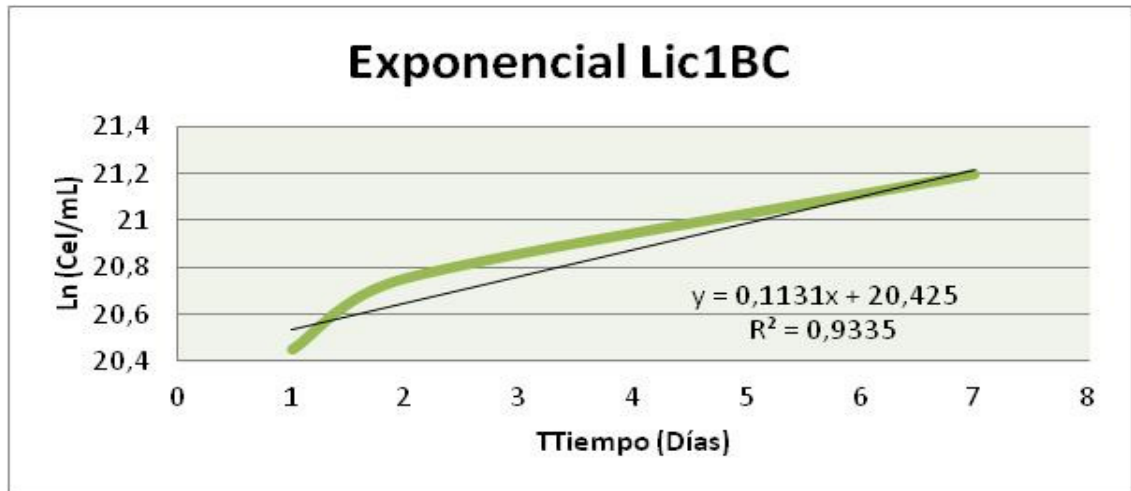
$$T_d = 72.64 \text{ HORAS}$$

**Anexo 20. CEPA AISLADA – MEDIO DE CULTIVO EMJH MODIFICADO**  
**AGITADO (Lic1BC)**

Día	Absorbancia	Cel/mL	Log	Ln
0	0,132	2,12E+08	8,32633586	19,1720968
1	0,474	7,61E+08	8,88154027	20,4505022
2	0,643	1,03E+09	9,0139729	20,7554396
3	0,639	1,03E+09	9,01126279	20,7491994
4	0,64	1,03E+09	9,0119419	20,7507631
5	0,641	1,03E+09	9,01261996	20,7523244
6	0,635	1,02E+09	9,00853566	20,7429199
7	1,002	1,61E+09	9,20662965	21,1990482
8	1,137	1,83E+09	9,26152239	21,3254434
9	1,277	2,05E+09	9,31195283	21,4415638
10	1,183	1,9E+09	9,27874667	21,3651038

**GRÁFICAS cepa aislada medio de cultivo EMJH modificado agitado (Lic1BC).**





**Cálculo parámetros de crecimiento microbiano para la cepa aislada en el medio de cultivo EMJH modificado agitado (Lic1BC) *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae.**

**NUMERO DE GENERACIONES (FASE EXPONENCIAL):**

	Densidad Poblacional cel / mL	Log cel / mL
Población Final (Nf)	1,61E+10	9,20662965
Población Inicial (No)	2,12E+08	8,32633586

$$n = 3,3 * \log N_f - \log N_o$$

$$n = 3,3 * (9,20662965 - 8,32633586)$$

$$n = 2.90 \times 10^7 \text{ células / mL.}$$

## VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO

	Densidad Poblacional En Horas	Densidad Poblacional cel / mL	Ln (Logaritmo natural) Nf y No
Tiempo Final (Tf)	360	1,61E+10	21,1990482
Tiempo Inicial (To)	192	2.12E+08	19,1720968

$$\mu = \ln N_f - \ln N_o / (T_f - T_o)$$
$$\mu = (21,1990482 - 19,1720968) / (360 - 192)$$

$$\mu = 4.5 \times 10^{-3} \text{ células / h}$$

## CONSTANTE DE VELOCIDAD RELATIVA DE CRECIMIENTO

$$K = 2.303 * (\log N_f - \log N_o / T_f - T_o)$$
$$K = 2.303 * (9,20662965 - 8,32633586) / (360 - 192)$$

$$K = 4.5 \times 10^{-3} \text{ células / h}$$

## TIEMPO DE DUPLICACIÓN (Td)

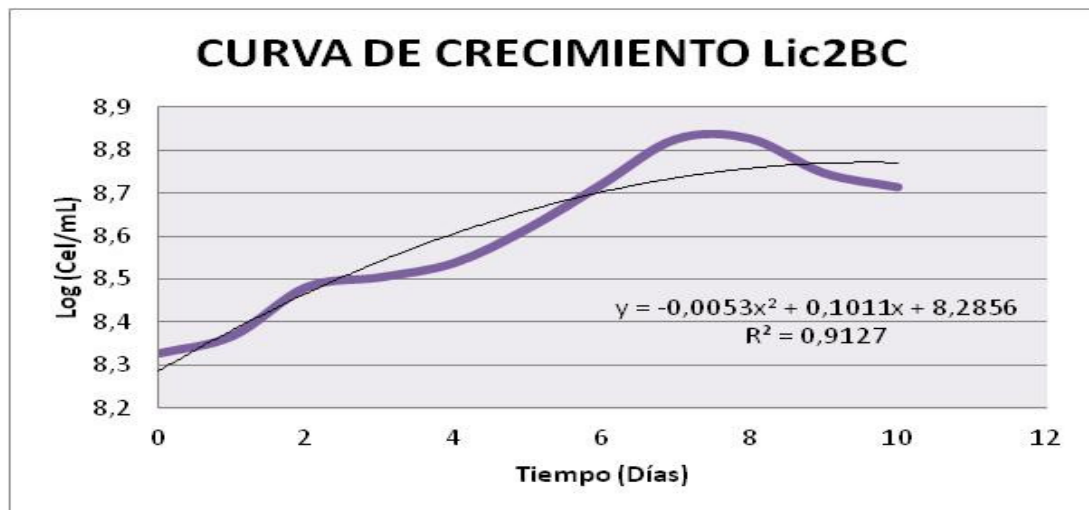
$$T_d = t / n$$
$$T_d = (360 - 192) / 2.90 \times 10^7 \text{ cel / mL}$$

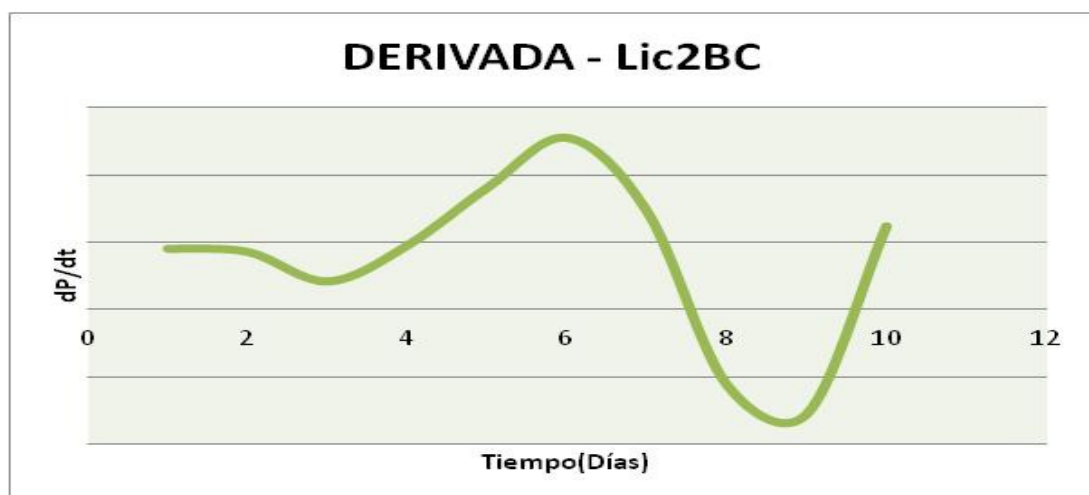
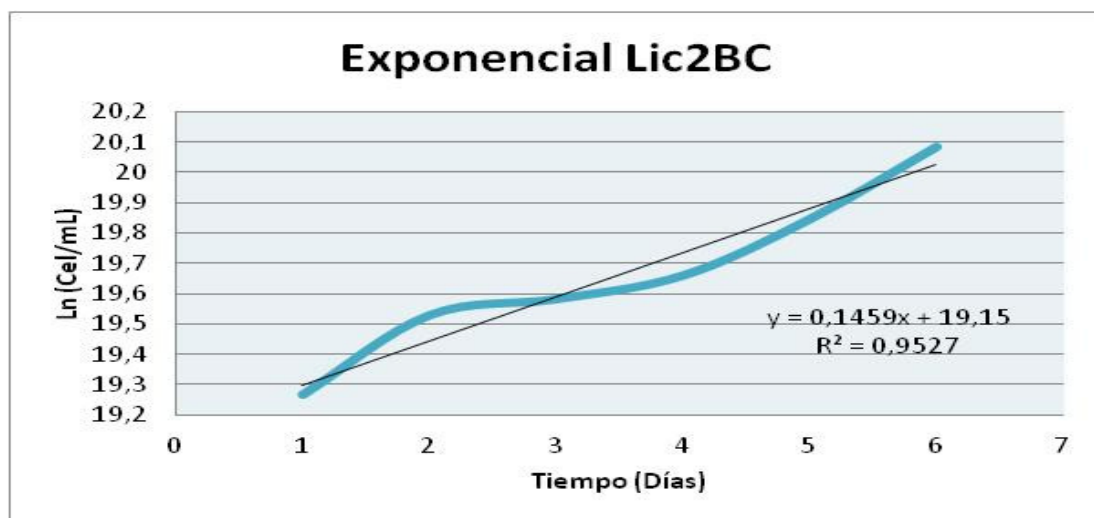
$$T_d = 57.83 \text{ HORAS}$$

**Anexo 21. CEPA CONTROL – MEDIO DE CULTIVO EMJH MODIFICADO**  
**AGITADO (Lic2BC)**

Día	Absorbancia	Cel/mL	Log	Ln
0	0,452	2,12E+08	8,32633586	19,1720968
1	0,497	2,33E+08	8,36755381	19,2670047
2	0,646	3,03E+08	8,48142994	19,5292142
3	0,681	3,19E+08	8,50434454	19,581977
4	0,736	3,45E+08	8,53807524	19,6596448
5	0,886	4,16E+08	8,61863115	19,8451316
6	1,124	5,27E+08	8,72196374	20,0830637
7	1,432	6,72E+08	8,82714044	20,325242
8	1,437	6,74E+08	8,82865419	20,3287275
9	1,194	5,6E+08	8,74820175	20,1434789
10	1,106	5,19E+08	8,71495255	20,0669198

**GRAFICAS cepa control medio de cultivo EMJH modificado agitado (Lic2BC).**





**Cálculo parámetros de crecimiento microbiano para la cepa control en el medio de cultivo EMJH modificado agitado (Lic2BC) *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae.**

**NUMERO DE GENERACIONES (FASE EXPONENCIAL):**

	Densidad Poblacional cel / mL	Log cel / mL
Población Final (Nf)	5,27E+08	8,72196374
Población Inicial (No)	2,12E+08	8,32633586

$$n = 3,3 * \log N_f - \log N_o$$

$$n = 3,3 * (8,72196374 - 8,32633586)$$

$$n = 1,17 \times 10^5 \text{ células / mL.}$$

## VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO

	Densidad Poblacional En Horas	Densidad Poblacional cel / mL	Ln (Logaritmo natural) Nf y No
Tiempo Final (Tf)	336	5,27E+08	20,0830637
Tiempo Inicial (To)	192	2,12E+08	19,1720968

$$\mu = \ln N_f - \ln N_o / (T_f - T_o)$$

$$\mu = (20,0830637 - 19,1720968) / (336 - 192)$$

$$\mu = 6.80 \times 10^{-3} \text{ células / h}$$

## CONSTANTE DE VELOCIDAD RELATIVA DE CRECIMIENTO

$$K = 2.303 * (\log N_f - \log N_o / T_f - T_o)$$

$$K = 2.303 * (8,721963737 - 8,326335861) / (336 - 192)$$

$$K = 6.80 \times 10^{-3} \text{ células / h}$$

## TIEMPO DE DUPLICACIÓN (Td)

$$T_d = t / n$$

$$T_d = (336 - 192) / 1.17 \times 10^5 \text{ cel / mL}$$

$$T_d = 102.60 \text{ HORAS}$$



## Anexo 22. Resultados estadísticos del crecimiento bacteriano en los medios EMJH convencional y modificado bajo condiciones de agitación.

A partir del plan de análisis se utilizó el programa spss para determinar las medidas de tendencia central en cada uno de los grupos de datos y la relación en los grupos experimentales.

### CULTIVO AGITADO

T1 → Cepa aislada medio convencional

T2 → Cepa control medio convencional

T3 → Cepa aislada medio modificado

T4 → Cepa control medio modificado

#### Descriptivos

CelxmL								
	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	11	2,7E+10	1,175E+10	3,54E+09	1,947E+10	3,5E+10	9,2E+09	4,36E+10
2	11	9,7E+09	4948435014	1,49E+09	6414687032	1,3E+10	3,4E+09	1,88E+10
3	11	1,2E+09	555519462	1,67E+08	854342401,8	1,6E+09	2,1E+08	2,1E+09
4	11	4,3E+08	165622078	49936935	323279028,6	5,5E+08	2,1E+08	6,7E+08
Total	44	9,7E+09	1,257E+10	1,89E+09	5868968453	1,4E+10	2,1E+08	4,36E+10

Para determinar la existencia de variación entre cada uno de los medios de cultivo y condiciones del cultivo planteadas en el trabajo se realizó el test de Kolmogorov-Smirnov para determinar normalidad y la prueba de Levene para homocedasticidad.

#### Pruebas de normalidad

		CelxmL
N		44
	Media	96900681 81,818180
Parámetros normales(a,b)	Desviación típica	12568258 152,79282 00
Diferencias más extremas	Absoluta	,228
	Positiva	,228
	Negativa	-,225
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,515
Sig. asintót. (bilateral)		,000

$p < 0.05$ , se rechaza la hipótesis y se concluye que los datos no provienen de una distribución normal.

En general, la falta de normalidad de los residuos no tiene gran efecto en el nivel de significancia del test F (La prueba F es estadísticamente robusta).

### Prueba de Homogeneidad

El valor de importancia para la homogeneidad de las diferencias es  $< 0.05$ , por lo que las varianzas de los grupos son significativamente diferentes. Dado que este es un supuesto de análisis de varianza, se fue muy cuidadoso en la interpretación de los resultados de esta prueba:

#### Prueba de homogeneidad de varianzas

CelxmL

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
17,378	3	40	,000

$p < 0.05$ , no se cumple el supuesto de homogeneidad de varianza. En este caso se calculo adicionalmente el Test de Welch prueba de comparación de medias que toma en cuenta este problema.

#### ANOVA

CelxmL

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	5,164E+21	3	1,72E+21	42,293	,000
Intra-grupos	1,628E+21	40	4,07E+19		
Total	6,792E+21	43			

Este es el resultado de ANOVA principal. El valor de significación comparando los grupos (el crecimiento cel/mL en cada Grupo experimental) es  $< 0,05$ , por lo que podría rechazar la hipótesis nula (no hay diferencia en las puntuaciones medias del crecimiento entre los cuatro grupos experimentales). Sin embargo, dado que las varianzas son significativamente diferentes, esto podría ser la respuesta equivocada. Por tal motivo se

calculó el Test de Welch y las estadísticas de Brown-Forsythe que permiten utilizar los datos en estas circunstancias:

**Pruebas robustas de igualdad de las medias**

CelxmL

	Estadístico <sup>a</sup>	gl1	gl2	Sig.
Welch	36,049	3	17,556	,000
Brown-Forsythe	42,293	3	13,496	,000

a. Distribuidos en F asintóticamente.

El valor de significación de estas pruebas son a la vez <0.05, por lo que todavía se rechaza la hipótesis nula. Sin embargo, este resultado no esta indicando que el crecimiento (cel/mL) es responsable de la diferencia, por lo que se requiere el resultado de la prueba post hoc:

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: CelxmL

	(I) NoTratamiento	(J) NoTratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD de Tukey	1	2	1,762E+10 *	2,72E+09	,000	1,033E+10	2,5E+10
		3	2,613E+10 *	2,72E+09	,000	1,884E+10	3,3E+10
		4	2,692E+10 *	2,72E+09	,000	1,963E+10	3,4E+10
	2	1	-1,7620E+10 *	2,72E+09	,000	-2,4912E+10	-1,0E+10
		3	8511545455 *	2,72E+09	,017	1219804924	1,6E+10
		4	9304545455 *	2,72E+09	,008	2012804924	1,7E+10
	3	1	-2,6132E+10 *	2,72E+09	,000	-3,3423E+10	-1,9E+10
		2	-8511545455 *	2,72E+09	,017	-1,5803E+10	-1,2E+09
		4	793000000,0	2,72E+09	,991	-6498740531	8,1E+09
	4	1	-2,6925E+10 *	2,72E+09	,000	-3,4216E+10	-2,0E+10
		2	-9304545455 *	2,72E+09	,008	-1,6596E+10	-2,0E+09
		3	-793000000	2,72E+09	,991	-8084740531	6,5E+09
Games-Howell	1	2	1,762E+10 *	3,84E+09	,002	6390303934	2,9E+10
		3	2,613E+10 *	3,55E+09	,000	1,529E+10	3,7E+10
		4	2,692E+10 *	3,54E+09	,000	1,609E+10	3,8E+10
	2	1	-1,7620E+10 *	3,84E+09	,002	-2,8850E+10	-6,4E+09
		3	8511545455 *	1,50E+09	,001	3938675045	1,3E+10
		4	9304545455 *	1,49E+09	,000	4739251403	1,4E+10
	3	1	-2,6132E+10 *	3,55E+09	,000	-3,6970E+10	-1,5E+10
		2	-8511545455 *	1,50E+09	,001	-1,3084E+10	-3,9E+09
		4	793000000,0 *	1,75E+08	,003	272534901,4	1,3E+09
	4	1	-2,6925E+10 *	3,54E+09	,000	-3,7760E+10	-1,6E+10
		2	-9304545455 *	1,49E+09	,000	-1,3870E+10	-4,7E+09
		3	-793000000 *	1,75E+08	,003	-1313465099	-2,7E+08

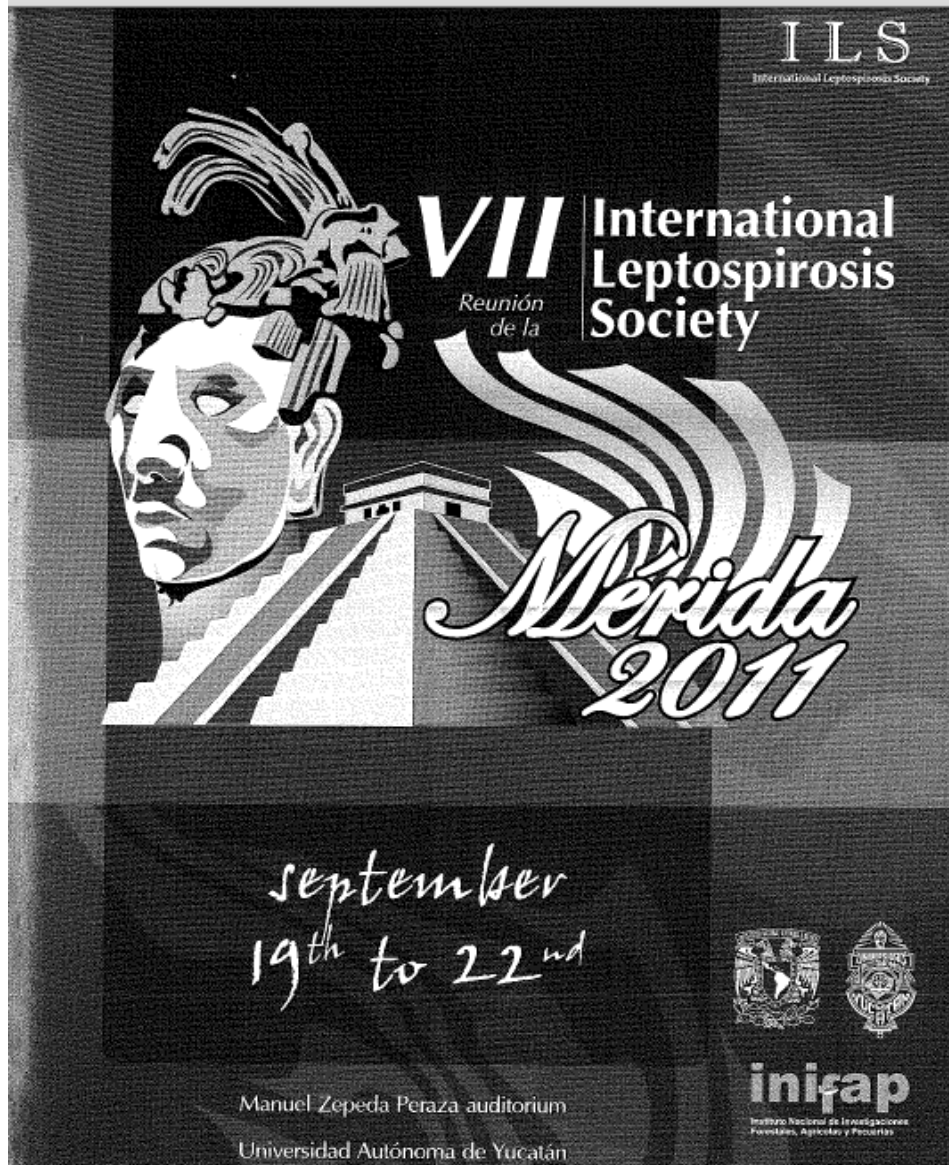
\*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

\* La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

La prueba de Tukey se basa en la homogeneidad de la varianza, por lo que se ignoraron estos resultados. La Games-Howell prueba post-hoc no se basa en la homogeneidad de

varianza (es por eso que se utilizó esta prueba post-hoc) y por lo tanto pueden ser utilizados los resultados. Resultado: Los cuatro modelos experimentales producen resultados significativamente diferentes. Hay una diferencia significativa entre el crecimiento (cel/mL) del medio modificado y el convencional para las dos cepas estudiadas en condiciones de agitación.

Anexo 23. Resultados directos del Trabajo.





**Evaluation of the culture EMJH conventional and modified medium for the growth of *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae under two conditions: static and agitated.**

Rosario Santos Arias<sup>1\*</sup>, Arlen Gómez Ramírez<sup>2,3</sup>, <sup>4,5,6</sup>Patricia Hernández-Rodríguez

<sup>1</sup>Biology and Microbiology Laboratory - Department of Basic Sciences; <sup>2</sup>Epidemiology and Public Health Research Group; <sup>3</sup> Faculty of Agricultural Sciences - Veterinary Medicine Program; <sup>4</sup>Director of Molecular Biology and Immunogenetics Research Group – BIOMIGEN; <sup>5</sup>Department of Basic Sciences - Biology Program; <sup>6</sup>Animal Medicine and Reproduction Research Center – CIMRA. Universidad de La Salle. Bogotá, Colombia.

The nutritional requirements of *Leptospira* spp make it a slow-growing organism and difficult to maintain, so that several studies have evaluated the chemically defined nutrient medium that stimulate growth and promote sustainability. However, maintenance of the strains increase in research costs, then you must make successive subcultures that cause loss of virulence of the strains. The objective of this research project was to evaluate the Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) medium conventional and modified against the growth of ATCC control *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae strain and a strain of *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae isolated of bovine urine. Population density was determined under controlled growing conditions for the static medium and agitation by spectrophotometry. The results showed that the growth rate under static conditions of *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae isolated was  $6.7 \times 10^6$  cell/h<sup>-1</sup> conventional medium >  $1.7 \times 10^4$  cell/h<sup>-1</sup> modified medium and the reference strain of  $2.8 \times 10^6$  cell/h<sup>-1</sup> conventional medium >  $3.2 \times 10^3$  cell/h<sup>-1</sup> modified medium. For the condition of agitation, the growth rate of the control strain in conventional medium was  $9 \times 10^6$  cell/h<sup>-1</sup> >  $8.1 \times 10^4$  cell/h<sup>-1</sup> modified medium. The growth rate of the isolated strain in conventional medium was  $3.4 \times 10^7$  cell/h<sup>-1</sup> >  $7.5 \times 10^4$  cell/h<sup>-1</sup> modified medium. It was concluded that the growth rate was better in the conventional medium with respect to modified under both growth conditions; however, the results showed that growth during the exponential phase was maintained for longer during the modified crop in agitation. From the results obtained of the culture medium modified and agitation to help reduce maintenance costs of the strains of *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae and will be useful for further research with other serovars of difficult growth.

# asm2012

112th General Meeting | June 16-19 | San Francisco, California

April 24, 2012

RE: Abstract 12-GM-A-3985-ASM

Patricia Hernández-Rodríguez

Carrera 2da # 10-70

Bogotá 11001

Colombia

Dear Patricia Hernández-Rodríguez,

Thank you for agreeing to present your abstract as a poster during the asm2012 General Meeting, June 16-19, 2012, in San Francisco, California.

The schedule for your poster presentation is outlined below:

**Control Number:** 3985

**Abstract Title:** Identification And Characterization Of Genes Associated With Pathogenicity In Strains Of *Leptospira* Spp Isolated From Cattle By Real Time Pcr (qpcr)

**Authors:** P. Hernández-Rodríguez<sup>1</sup>, A. P. Gomez Ramirez<sup>1</sup>, M. M. Baquero<sup>1</sup>, R. Santos Arias<sup>1</sup>, M. L. Posada-Buitrago<sup>2</sup>;

<sup>1</sup>Univ. de La Salle, Bogotá, COLOMBIA, <sup>2</sup>Univ. del Rosario, Bogotá, COLOMBIA.

**Session Number:** 119

**Session Title:** Pathogenic Mechanisms, Disease Transmission and Host Response (Division Z)

**Poster Presentation Date/Time:** Monday Jun 18, 2012 10:45 AM - 12:30 PM

**Poster Board Number:** Your number will be provided in the coming week.

os sugeridos ▾ Galería de Web Slice ▾

ice ▾ Fotos ▾ | MSN ▾ cerrar sesión | HERNANDEZ RODRIGUEZ PATRICIA ▾

Encontrar a alguien Opciones ? ▾

From: jdenis@imaxio.com  
To: phernandez@unisalle.edu.co  
Subject: Article request  
Date: Tue, 29 Nov 2011 15:39:43 +0100

Dear Dr Hernandez-Rodriguez,

I am the head of pharmaceutical development at Imaxio, a french company which produces and distributes the human vaccine against leptospirosis, SPIROLEPT.

I attended the ILS meeting in Merida and was very interesting by the presentation expected to be done : "Evaluation of EMJH conventional and modified medium for the growth of *Leptospira interrogans* serovar Ictero under 2 conditions ". But, this presentation was not unfortunately not done, I hope all is fine for you.

I would like to know if you do you have an article or available datas around this presentation ?

Thanks by advance for your answer,

Best regards,

**Jérôme DENIS, PhD**  
*Head of pharmaceutical development*  
*Responsable du développement pharmaceutique*

**IMAXIO**  
181-203, avenue Jean Jaurès  
69007 Lyon  
tél: + 33 (0) 6 896 843 37  
fax: + 33 (0) 4 376 506 17  
[www.imaxio.com](http://www.imaxio.com)