



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EVALUACIÓN DE UN ENSAYO INMUNO-
ENZIMÁTICO PARA
EL DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSIS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA
RAQUEL ROJANO RIOS**

**ASESORES: FRANCISCO J. BASURTO ALCÁNTARA
ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA
MARÍA ALEJANDRA AYANEGUI ALCÉRRECA**

MÉXICO DF, AGOSTO 2009





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

A mis padres: Víctor Rojano y Bertha Rios por darme la vida, el amor y la sabiduría para enfrentar los retos.

Por brindarme la oportunidad de realizar este sueño.

Gracias por su apoyo, comprensión y confianza.

A mis hermanas: Verónica y Claudia, por ser mí ejemplo a seguir.

Gracias por su cariño, consejo y paciencia.

A Oscar Carrillo por acompañarme en el camino y hacerlo divertido.

Gracias por estar a mi lado siempre.

Con mucho cariño Raquel.

*"La ciencia se puede aprender de memoria, pero la sabiduría no".
Lawrence Sterne.*

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, por permitirme la realización de mis estudios y la culminación de los mismos.

Al departamento de Microbiología e Inmunología por todas las facilidades para la realización de este trabajo.

El presente trabajo fue desarrollado gracias al financiamiento de los siguientes proyectos:

Proyecto PAPIIT IN222806

Proyecto con laboratorios Fort Dodge: " Determinación de la presencia de *Leptospira* en perros de la Ciudad de México y evaluación de la respuesta inmune a una vacuna de cuatro vías (Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae y Pomona)" No. de registro: 18595-880-3-VII-06.

Macroproyecto 7: "Productividad sostenible en ganado de cría en pastoreo. Área II: Enfermedades Infecciosas". *Leptospira*

A mis asesores: Dr. Francisco Basurto Alcántara, Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma, Dra. Alejandra Ayanegui Alcérreca. Por mostrarme el camino a seguir, por sus consejos, regaños y sobre todo gracias por su amistad y su tiempo.

A los integrantes del jurado, Dr. Carlos Julio Jaramillo, Dr. Daniel Martínez, Dra. Marcela Figueroa, Dra. Alejandra Mercadillo. Por sus comentarios y reflexiones para el enriquecimiento del presente trabajo.

Al Dr. Armando Rodríguez por despertar en mi el gusto e interés por la microbiología, por transmitirme sus conocimientos y confiar en mí.

A MVZ M.C. Erika Carrillo por permitirme aprender de ella, por enseñarme a trabajar en el laboratorio y brindarme su valiosa amistad.

A todos mis compañeros y amigos del GriLLep, Rodrigo Mena, Alejandro Rodríguez, José Manuel Ramírez, Tania Simental, Elena Alcaraz, Liliana Ordoñez, Lupita Núñez, Verónica Montes, Olivia Castillo, Carlos Carmona, Rocío Lima, por todos los conocimientos compartidos, su apoyo, tolerancia y compañía.

Al MVZ Daniel Atilano por sus valiosos consejos y comentarios.

A la MVZ Esp. María Cristina Rodríguez por su, interés, apoyo y disposición durante este proceso.

Al Dr. Roberto Cervantes, por su valioso apoyo y comprensión.

A todos los integrantes del departamento de microbiología e inmunología, por su disposición de colaborar.

A la Dra. Beatriz Rosado por estar siempre al pendiente de mi trabajo, por su comprensión y confianza.

Al equipo de Condesa Pet Center: Yadira, Bere, Mariana, Laura, Ariel, Sra. Beatriz, Martha, Diana, Sabrina, Issac, Marco, Ricardo, Luis. Por su apoyo, disposición y amistad.

A todos mis amigos de ayer y hoy, a Lupita, Miros, Adriana, Mariana, Edgar, Adria, Gus, Kari, Laura, Flavio, Dianita, Alma, Axel, Manuel. etc. Por ser parte de este proceso y brindarme su amistad.

INDICE DE CUADROS

		pagina
1.1	Clasificación taxonómica de <i>Leptospira</i> .	14
1.2	Especies reconocidas como patógenas y apatógenas dentro del género <i>Leptospira</i>	15
1.3	Genomoespecies reclasificadas taxonómicamente.	16
1.4	Patogenia de la leptospirosis	21
1.5	Relaciones epidemiológicas de serovariedades de <i>Leptospira</i>	26
1.6	Ejemplos de clasificación epidemiológica, presentación clínica y principales lesiones en leptospirosis por serovariedad.	28
1.7	Comparativo de diagnóstico de leptospirosis.	33
3.1	Relación de Sueros Control Utilizados	46
3.2	Condiciones establecidas para el primer ensayo	49
3.3	Condiciones establecidas para el segundo ensayo	49
3.4	Condiciones establecidas para el tercer ensayo	50
3.5	Condiciones establecidas para el cuarto ensayo	50
3.6	Condiciones establecidas para el ensayo piloto de punto de corte.	51
3.7	Condiciones establecidas para el ensayo de punto de corte con sueros control de bovino.	51
3.8	Condiciones utilizadas para el estudio de frecuencia relativa por prueba de ELISA con sueros de bovino.	52
3.9	Descripción de pruebas estadísticas descriptivas o analíticas empleadas durante la investigación.	53
3.10	Equivalencias para la utilización de formulas	54
3.11	Formulas utilizadas para los análisis estadísticos	54
4.1	Títulos de aglutinación microscópica en sueros hiperinmunes de conejos.	57
4.2	Precisión: Porcentaje de clasificación correcta o incorrecta en ELISA.	72
4.3	Análisis estadístico utilizado entre los resultados entre ELISA y Aglutinación microscópica.	72

INDICE DE FIGURAS

	pagina
1.1 Estructuras de <i>Leptospira</i> :	17
1.2 Estructura de membrana y pared celular	18
1.3 Triada epidemiológica en leptospirosis.	23
1.4 Diagrama de un inmunoensayo indirecto	31
4.1 Gel de poliacrilamida	56
4.2 Resultados del primer ensayo con membranas desnaturalizadas.	58
4.3 Resultados del primer ensayo con membranas nativas.	59
4.4 Resultados del primer ensayo con <i>Leptospiras</i> totales.	60
4.5 Resultados del segundo ensayo con membranas nativas.	61
4.6 Resultados del segundo ensayo con <i>Leptospiras</i> totales.	62
4.7 Resultados del tercer ensayo con <i>Leptospiras</i> totales.	63
4.8 Resultados del cuarto ensayo con <i>Leptospiras</i> totales con sueros de bovino	64
4.9 Resultado de la desviación estándar para establecer punto de corte de con sueros de conejo.	65
4.10 Resultado de la desviación estándar para establecer punto de corte de con sueros de bovino.	66
4.11 Resultado de diferentes testigos de bovino	67
4.12 Comparación del coeficiente de variación intra y entre placas para establecer punto de corte para los sueros bovino.	68
4.13 Comparación de media de la densidad óptica y error estándar para los sueros bovino.	69
4.14 Coeficiente de variación entre réplicas de 100 sueros de bovinos	70
4.15 Comparación de la frecuencia relativa entre Aglutinación microscópica y ELISA.	71

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Aspectos Históricos Generales	9
1.1.1 Leptospirosis en medicina veterinaria	11
1.1.2 Leptospirosis en México	12
1.1.3 Relevancia general de la leptospirosis	13
1.2 MARCO TEÓRICO	14
1.2.1 Agente Etiológico	14
1.2.1.1 Taxonomía	14
1.2.1.2 Estructura bacteriana	16
1.2.1.3 DNA y pared celular.	17
1.2.1.4 Lipopolisacárido (LPS)	18
1.2.1.5 Desarrollo in vitro.	19
1.2.1.6 Patogenia	20
1.2.1.7 Inmunología	22
1.3 MARCO REFERENCIAL	23
1.3.1 Epidemiología	23
1.3.1.1 Factores ambientales	24
1.3.1.2 Factores del hospedero	24
1.3.2 Zoonosis	27
1.3.3 Presentación clínica	27
1.3.4 Diagnóstico	29
1.3.4.1 Pruebas Indirectas	30
1.3.4.2 Pruebas Directas	32
1.3.5 Prevención y control.	34
1.3.6 Normatividad	35
CAPÍTULO II JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	36
2.1 JUSTIFICACIÓN	37
2.2 HIPÓTESIS	37
2.3 OBJETIVO GENERAL	37
2.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS	39
3.1 Cultivo bacteriano	40
3.2 Técnicas moleculares	40
3.2.1. Extracción de la membrana externa	40
3.2.1.1 Extracción de Material Completo	40
3.2.1.2 Separación de membrana externa en fase acuosa y detergente.	41
3.2.1.3 Lavado de las fracciones	41
3.2.1.4 Precipitación con acetona	41
3.2.1.5 Visualización de las proteínas de las fases acuosa y detergente:	42
3.2.2 Hidrólisis de la proteína	42
3.2.3 Cuantificación de la proteína	43
3.3 PREPARACIÓN DE SUEROS TESTIGO	43
3.3.1 Preparación del antígeno para inoculación	43
3.3.1.1 Desnaturalización de proteínas	43
3.3.1.2 Preparación del Inóculo de membranas externas	43
3.3.1.3 Preparación del inóculo de leptospiras completas	44
3.3.2 Inmunización de animales	44
3.3.3 Estandarización del ELISA	44

3.3.3.1 Sueros Testigo	45
3.3.3.2 Sueros de Bovino para evaluación del ensayo	45
3.4 Aglutinación Microscópica	46
3.5 Estandarización de ELISA	47
3.5.1 Antígenos de Captura	47
3.5.1.1 Antígeno de captura de leptospiras totales.	47
3.5.1.2 Antígeno de captura de membranas externas desnaturalizadas	47
3.5.1.3 Antígeno de captura de membranas externas nativas	48
3.5.2 Unión del antígeno a la fase sólida.	48
3.5.2.1 Unión Antígeno-Anticuerpo	48
3.5.3 Primer ensayo de estandarización de ELISA con suero de conejo.	49
3.5.4 Segundo Ensayo	49
3.5.5 Tercer Ensayo	50
3.5.6 Cuarto Ensayo	50
3.5.7 Ensayo piloto para punto de corte	51
3.5.8 Ensayo Punto de corte	51
3.5.9 Ensayo sueros de campo	52
3.6 Análisis estadístico	52
CAPÍTULO IV RESULTADOS	55
4.1 Preparación de antígenos (Cultivo bacteriano)	56
4.2 Preparación de antígenos (Extracción de la membrana externa)	56
4.2.1 Visualización de proteínas	56
4.3 Muestras de suero para monitoreo de conejos en producción de sueros testigo.	57
4.4 Resultados de ELISA con los diferentes antígenos de captura.	57
4.4.1 Primer ensayo	57
4.4.2 Segundo ensayo	61
4.4.3 Tercer ensayo	62
4.4.4.- Cuarto ensayo	64
4.5 Identificación de condiciones óptimas para el ensayo de ELISA (ensayo piloto).	65
4.6 Punto de corte y repetibilidad de ELISA con sueros control de bovino.	67
4.7 Evaluación de repetitividad de ELISA para Leptospira con sueros de bovino de población abierta.	68
4.8 Comparación de frecuencia relativa de bovinos entre ELISA y AM.	70
4.9 Análisis comparativo entre los resultados entre ELISA y AM como prueba estándar.	71
CAPÍTULO V DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	73
5.1 Discusión	74
5.2 Prospectivas	81
5.3 Conclusiones	81
CAPÍTULO VI LITERATURA CITADA	82
APÉNDICE 1 SOLUCIONES Y REACTIVOS.	92
APÉNDICE 2 BASE DE DATOS.	99
APÉNDICE 3 DISCUSION DE MEMBRANAS EXTERNAS	114

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

*"Las personas trascienden cuando su obra perdura más que su propia vida".
Francisco J. Basurto A.*

1. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis ha sido reconocida como la zoonosis más difundida en el mundo.^{1, 2} Dado que se mantiene en la naturaleza dentro de los túbulos renales de los animales infectados. Los reservorios más importantes son los roedores, que pueden transmitir la enfermedad a los animales domésticos y a los humanos tanto en el medio rural como urbano, en países desarrollados y subdesarrollados. También es conocida comúnmente como enfermedad de las porquerizas, enfermedad de Stuttgart o enfermedad de Weil.^{1, 2, 3}

Es ocasionada por espiroquetas patógenas del género *Leptospira*, se asocia con cuadros febriles, hemorragia, ictericia, insuficiencia renal, uremia en caninos, infertilidad, abortos y nacimiento de animales débiles en ganado, lo que ocasiona considerables pérdidas económicas en estos sectores. Es considerada un problema de salud pública debido a que el humano es un hospedero accidental y una enfermedad ocupacional de agricultores, ganaderos, trabajadores de mataderos, trabajadores, alcantarillado, plomeros, médicos veterinarios, bomberos y personal de laboratorios, entre otros.^{1, 2, 3} La principal vía de infección para el contagio es el contacto directo o indirecto con la orina de los animales infectados.

Este microorganismo tiene una alta supervivencia en climas húmedos tropicales y en suelos lodosos, aunque muere rápidamente si no cuenta con humedad.^{1, 2}

El diagnóstico de leptospirosis puede realizarse por medio de la detección de anticuerpos anti-leptospira por la prueba de aglutinación microscópica (AM), que es considerada como de referencia y es empleada a nivel mundial. Los ensayos inmuno-enzimáticos (ELISA) también están basados en la detección de la unión del antígeno con el anticuerpo específico. Los métodos directos disponibles son métodos moleculares, para la detección de ADN de *Leptospira* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la observación directa de leptospiras en tejidos mediante tinciones o bien la observación en campo oscuro. Mientras que el aislamiento es considerado como diagnóstico definitivo aunque este es poco práctico.³

1.1 Aspectos Históricos Generales

La leptospirosis es una enfermedad infecto-contagiosa la cual fue descrita en los anales médicos en 1803, cuando el doctor Wittman describió un caso sugestivo de esta enfermedad entre unos viajeros de Asia Menor y del desierto de Egipto. Denominada enfermedad de Weil varios años más tarde, considerando éste como el primer reporte en Europa de un caso de leptospirosis epidémica.³

El doctor Adolf Weil en 1886 describió los signos clínicos de una enfermedad febril acompañada de trastornos renales, hepatitis, esplenomegalia e ictericia generalizada en cuatro humanos. Un año después, Goldmich empleó el término de “enfermedad de Weil” para denominar este síndrome, cuando se trataba de un cuadro icterico.³

Posteriormente, Stimson por el año de 1907, tiñó tejidos de pacientes presuntamente fallecidos de fiebre amarilla, en los que encontró, en el riñón, unos organismos en forma espiral con un gancho en su porción terminal a los cuales denominó “*Spirochaeta interrogans*”; asimismo, describió la acumulación de leptospiras en el lumen de los túbulos renales, lo que fue relacionado con el mecanismo de diseminación de la enfermedad. Posteriormente, Hideyo Noguchi realizó una descripción similar en 1928.³

En Japón, Inada y colaboradores en el año 1916, denominaron a la bacteria causante de esta patología como, *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*. Al siguiente año el investigador japonés Noguchi logró aislar la bacteria a partir de ratas silvestres capturadas en la ciudad de Nueva York y las comparó con otros aislados en Japón, Bélgica y Estados Unidos, proponiendo la creación del género *Leptospira*.⁴

Poco tiempo después las leptospiras fueron reconocidas como el agente causal de la enfermedad de Weil, reconociendo la importancia que tienen las ratas en la transmisión de la infección. Con estos sucesos se abrió el camino para entender la epidemiología de la enfermedad, su transmisión por animales portadores; proponer mecanismos de control, comenzar con investigaciones en otros animales para detectar posibles reservorios y la importancia que éstos tienen en la transmisión de la leptospirosis al hombre.⁴

A partir de estos sucesos se identificó, que varias enfermedades de origen desconocido hasta entonces, como el caso de la enfermedad de “Nanukayami” o fiebre japonesa de los siete días, era causada por *Leptospira* serovariedad Hebdomadis,⁴ y la enfermedad conocida como “Akiyami” o la fiebre de los cosechadores, era ocasionada por *Leptospira* serovariedad Autumnalis.⁵

La investigación acerca de la leptospirosis tomó fuerza con una serie de trabajos de gran importancia para el conocimiento de las mismas, como por ejemplo, la leptospirosis anictérica,⁶ la aglutinación-lisis,^{7,8} la inmunización activa,⁹ el estado de portador en los animales,¹⁰ la infección en perros¹¹ y la diferenciación serológica de las leptospiras.^{12,13}

Las primeras publicaciones sobre la morfología de las leptospiras se le atribuyeron a Hideyo Noguchi en 1918, quien a pesar de las limitaciones que tuvo con el uso del microscopio óptico, describe su estructura y la compara microscópica y serológicamente con otras espiroquetas.³

En una de sus investigaciones, Noguchi en Guayaquil, Ecuador, obtuvo tejido hepático de pacientes que supuestamente habían fallecido por fiebre amarilla, logrando el aislamiento de una espiroqueta en un medio de cultivo que contenía riñón y líquido ascítico de cobayo y a este aislamiento lo denominó “*Spirochaeta icteroides*”. Basado en esta experiencia, se pensó que esta espiroqueta era la causa de la fiebre amarilla y que estaba estrechamente relacionada con la enfermedad de Weil. No fue hasta 1929 que se demostró lo contrario cuando se concluyó que la fiebre amarilla es causada por un virus y no por una espiroqueta como se había pensado en un principio.³

1.1.1 Leptospirosis en medicina veterinaria.

Hasta 1930, la leptospirosis es reconocida como un problema en medicina veterinaria y origen de algunas infecciones en humanos, al observar espiroquetas en sangre, orina y riñón en cuadros de ictericia, Debido a que dicho cuadro clínico era similar al presentado en perros cuando se inoculaban con *Leptospira Icterohaemorrhagiae* agente causal de la enfermedad de Weil, se supuso que era ocasionado por el mismo microorganismo y es denominada como enfermedad de Stuttgart.^{3,14}

Sin embargo en 1933 Klarenbeek y Schüffner,¹⁵ investigadores holandeses demostraron que la enfermedad de Stuttgart era ocasionada por otro agente serológicamente diferente al de la enfermedad de Weil. Organismo que posteriormente fue conocido como *Leptospira canicola*.¹⁶

La leptospirosis en bovinos fue identificada por Michin y Azinov,¹⁷ en Rusia en 1935 en un principio se pensó que Grippotyphosa y Pomona eran las principales serovariedades responsables de la enfermedad, especialmente en ganado productor de leche, fue entonces que comenzó a tomar fuerza las repercusiones que tiene la leptospirosis en la salud pública y su importancia económica. En los años 1975 a 1985 se reconoció que la infección en bovinos era ocasionada por la serovariedad Hardjo, que es considerada actualmente como el principal agente causal de la leptospirosis en bovinos a nivel mundial.^{3, 16, 17, 18}

Mientras que en 1945 se dieron a conocer los primeros reportes en Suiza de una enfermedad en el hombre que llamaban “enfermedad de las porquerizas” ya que se presentaba en personas que habían estado en contacto con cerdos infectados. Una infección similar ya había sido reportada en Estados Unidos, causada aparentemente por *Leptospira* serovariedad Pomona.³

En 1999 Faine *et al.*,³ realiza un libro donde reporta que la infección por *Leptospira* afecta diversas especies domésticas de producción como es el caso de bovinos, cerdos, ovinos y caprinos en los cuales la importancia de esta enfermedad tiene un impacto económico considerable así como la infección en animales de compañía como: perros, gatos. En fauna silvestre diversas especies de mamíferos terrestres y acuáticos así como roedores son los más afectados, el principal problema es que estas especies actúan como reservorios y contribuyen a la dispersión del microorganismo, ya que estos animales no cuentan con ningún tipo de vacuna o tratamiento. Los animales de laboratorio como: ratas, ratones, cuyes y conejos tradicionalmente han sido utilizados para el estudio de esta enfermedad debido a la practicidad de mantener dichos animales en un ambiente controlado y la posibilidad de infectar a estos con algunas serovariedades.^{2,3}

1.1.2 Leptospirosis en México.

En México la leptospirosis tuvo sus inicios cuando el investigador Hideyo Noguchi, viene al país para investigar un brote de fiebre amarilla, en una comunidad de Yucatán en 1919.¹⁹

Con la sangre obtenida de los pacientes realizó frotis de los cuales sólo en un caso encontró formas sugerentes a leptospiras, a partir de éste inoculó en medios de cultivo y logró de esta manera el primer aislamiento, así como también el primer reporte de un caso de leptospirosis humana en México.. Sin embargo, con base en sus experiencias previas con fiebre amarilla dio por hecho que no se trataba de un brote de leptospirosis y sólo impartió una conferencia acerca de la leptospirosis en el país.¹⁹

En 1958 se registró el primer brote epidémico en las comunidades de Kinchil y Tetiz en Yucatán.²⁰ A partir de este brote, el interés por la leptospirosis en México ha continuado con investigaciones de seroprevalencia mediante la determinación de anticuerpos, como en el caso del estudio realizado por Gastélum en 1933, realizado en Mazatlán.²¹ Siguiendo con Varela y Vázquez en 1953 “Nota preliminar acerca de la leptospirosis en la ciudad de México” (1953).²²

En la ciudad de México los estudios en humanos iniciaron con Mendoza en 1958, en pacientes del Hospital La Raza del IMSS, donde se encontró un 9.8% de seropositivos, predominando la

serovariedad Canicola en un 77.75%.²³ Posteriormente, Varela y Zavala en 1961, encontraron en el laboratorio del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales de la entonces SSA en México, el 2.8% de seropositividad en 282 sueros de habitantes de Mérida.²⁴ En 1997 se encontró una seroprevalencia de 13.1%, identificando a las serovariedades Pomona 3.4% e Icterohaemorrhagiae 1.2% como las más importantes.

Por otra parte estudios más recientes, donde se realizó un análisis epidemiológico bibliográfico a nivel nacional de acuerdo a las regiones ecológicas de México en caninos de un total de 42,779 muestras, se obtuvo una seropositividad de 49.7% con una frecuencia promedio del 63.8% (31.7% al 84.6%) y las serovariedades más prevalentes fueron Hardjoprajitno, Wolffi y Tarassovi.²⁵

1.1.3 Relevancia general de la leptospirosis.

Debido a las pérdidas económicas que ocasiona la leptospirosis en la producción animal, así como el impacto que tiene como un problema ocupacional de salud pública, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y El *International Comite on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of Leptospiraceae* brindan su apoyo para las actividades que realizan los laboratorios de referencia como, el centro colaboradores de la FAO/OIE/OMS^I para la referencia e investigación en la región del Pacífico Occidental y la leptospirosis, en Brisbane Australia. WHO/FAO/OIE/RIVM Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis en Amsterdam,^{II} ²⁶ en estos lugares se mantienen las cepas de referencia, se clasifican los diferentes aislados y apoyan en la capacitación del personal oficial encargado del diagnóstico de leptospirosis.^{26, 27, 28} En la Ciudad de México se cuenta con el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE), encargado del diagnóstico de leptospirosis en humanos.^{III} Mientras que en el área veterinaria el CESASICA ^{IV} es el órgano oficial del diagnóstico en donde también participa el Centro de Investigación Disciplinaria (CENID) de Microbiología^V. El *International Comite on Systematics of Prokaryotes Subcommite on the taxonomy of Leptospiraceae* se encarga de tomar las decisiones acerca de la taxonomía y otros aspectos relacionados con este género, como el establecimiento y la homogenización de cepas de referencia.^{27, 28}

^I <http://www.health.qld.gov.au/qhcss/lepto.asp>

^{II} <http://www.kit.nl/smartsite.shtml?id=3925>

^{III} <http://www.cenavece.salud.gob.mx/indre/>

^{IV} <http://www.senasica.sagarpa.gob.mx>

^V <http://www.inifap.gob.mx>

1.1 MARCO TEÓRICO

1.2.1 Agente Etiológico

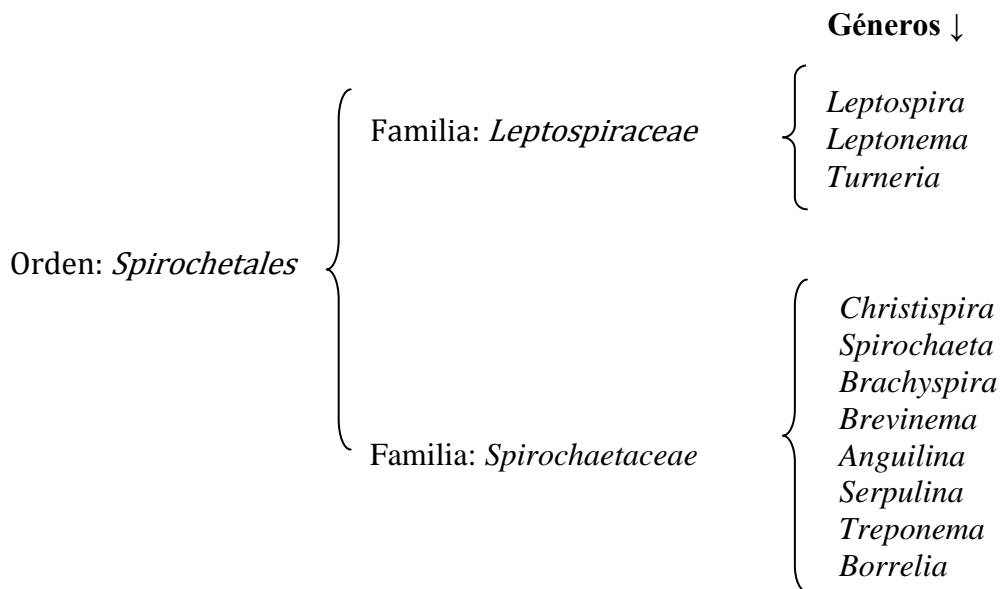
El nombre del agente causal de la leptospirosis fue propuesto por el investigador Hideyo Noguchi en 1917 por la morfología debido a que la palabra *Leptospira* proviene del griego *leptos*: que significa delgado; y del latín *spira*, por su forma característica de espiral.^{3, 29}

1.2.1.1 Taxonomía

El género *Leptospira* incluye espiroquetas con pared celular semejante al de bacterias Gram negativas que pertenecen a un grupo único que estructuralmente se encuentra dentro de la clase de las *Spirochaetales*, orden *Spirochetales*, familia *Leptospiraceae* y comprende tanto microorganismos saprófitos como patógenos los cuales pueden infectar a animales y el hombre (Cuadro 1.1).^{29 30}

Cuadro Sinóptico 1.1 Clasificación taxonómica de *Leptospira*.

(Adaptado de Quinn *et al*; 2002).³¹



Antes del año 1989 la clasificación sólo se basaba en las reacciones serológicas, divididas por un lado en, *Leptospira biflexa* con serovariedades apatógenas y *Leptospira interrogans* para las patógenas. Dicha clasificación tiene su base en la diversidad y similitud del lipopolisacárido (LPS), la cual es la región más antigénica del microorganismo por encontrarse expuesta en la membrana externa de las leptospiras donde se reconocen 28 serogrupos, más de 260 serovariedades patógenas

y 60 serovariedades apatógenas.^{1, 3, 32} En la actualidad se manejan dos tipos de clasificación de forma simultánea, la serológica y la genómica, esta última basada en la hibridación de ADN de la que se desprenden 15 especies patógenas y 4 especies saprofitas.^{27, 28} (Cuadro 1. 2 y 1.3).

Cuadro 1.2. Especies reconocidas como patógenas y apatógenas dentro del género *Leptospira* con base en la clasificación genómica.^{27, 28}

Especies Patógenas	Especies Saprofitas
<i>L. alexanderi</i>	<i>L. biflexa</i>
<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. kmteyi*</i>
<i>L. fainei</i>	<i>L. meyeri</i>
<i>L. inadai</i>	<i>L. wolbachii</i>
<i>L. interrogans</i>	
<i>L. kirschneri</i>	
<i>L. licerasiae *</i>	
<i>L. noguchii</i>	
<i>L. santarosai</i>	
<i>L. weilli</i>	
<i>L. wolfii*</i>	
<i>L. alstonii*</i>	
<i>L. vanthielii*</i>	
<i>L. terpstrae*</i>	
<i>L. yanagawe*</i>	

(*)Aprobadas recientemente por el *Internacional Comité on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of Leptospiraceae*.

¹ Pasteur Institut. "PasteurInstitut.org (homepage on the Internet) Paris: Unité de Bactériologie Moléculaire et Médicale, 2006. Available from: <http://www.pasteur.fr/recherche/Leptospira/Leptospira.html>

Cuadro 1.3. Genomoespecies reclasificadas taxonómicamente.^{27, 28}

Clasificación anterior Institut Pasteur UBM, 2006	Reclasificación ILS 2007
Genomoespecie 1	<i>L. alstonii</i>
Genomoespecie 3	<i>L. vanthieilii</i>
Genomoespecie 4	<i>L. terpstrae</i>
Genomoespecie 5	<i>L. yanagawae</i>

Por otra parte, se sabe que existen serovariedades que poseen ciertas peculiaridades como es el caso de Hardjo con dos subtipos: Hardjobovis perteneciente a la especie *L. borgpetersenii* y Hardjopratinjo que forma parte de *L. interrogans*, las cuales a pesar de ser de especies diferentes forman un subtipo debido a que por aglutinación microscópica (AM) son indistinguibles.³³

1.2.1.2 Estructura bacteriana

El género *Leptospira* comprende a un grupo de espiroquetas tanto saprófitas como patógenas, muy delgadas y flexibles de 6 a 10 μm de largo por 0.1 μm de diámetro, con terminación en forma de gancho. Altamente móviles, esto debido a que posee dos endoflagelos que envuelven el cilindro protoplásmico y que se insertan sub-terminalmente en la membrana citoplasmática.³⁴ Este tipo de flagelo también se denomina filamento axial y está constituido por dos tipos de proteínas, el primero es una proteína con similaridad en la secuencia de aminoácidos para la flagelina bacteriana y que forma la médula del flagelo (FlaA), mientras que el segundo tipo de proteína (FlaB) forma la envoltura del flagelo.³⁵ Ambos tipos de proteínas son conservados entre las distintas especies de *Leptospira* y realizan movimientos de flexión y extensión mientras el organismo gira alrededor de su mismo eje.^{3, 31, 36} (Figura 1.1)

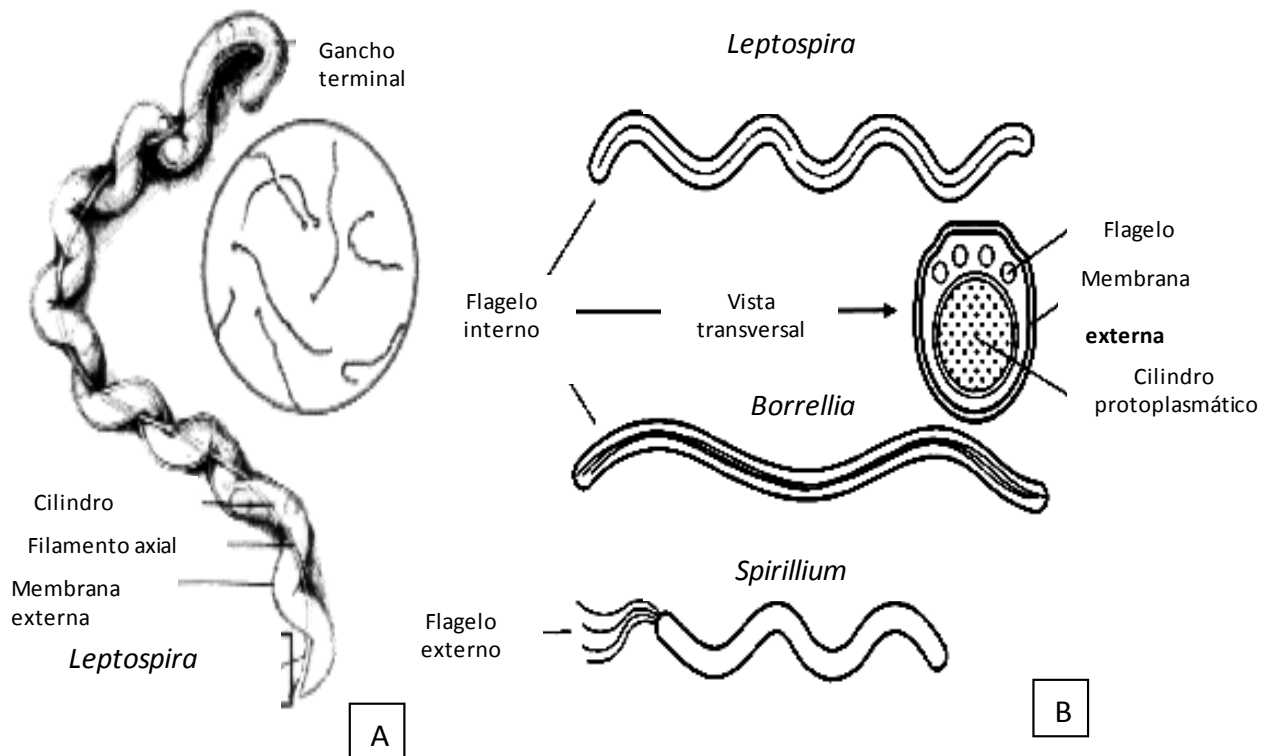


Figura 1.1 Estructuras de *Leptospira*: A) Diagrama que indica ganchos terminales, cilindro protoplasmático, filamento axial y membrana externa tomado de Greene CE, 1990.³⁶ B) Esquema comparativo de las principales estructuras de *Leptospira* (Flagelo Interno (Endoflagelo), membrana externa, cilindro protoplasmático) comparando con otras espiroquetas y con espirilos (Flagelo externo) tomado de Quinn *et al* 2002.³¹

1.2.1.3 DNA y pared celular.

El genoma de *Leptospira* posee dos cromosomas circulares; el replicón mayor es de 3.6 a 4.3×10^6 pares de bases (pb) y contiene la mayor parte de los genes requeridos para el desarrollo; el tamaño de cromosoma pequeño es de 277 a 350×10^3 pb y contiene genes esenciales para la biosíntesis de aminoácidos, en total ambos tienen más de 3,590 genes que codifican para proteínas.^{37, 38, 39, 40, 41}

Esta espiroqueta tiene una pared celular (péptidoglicano) con estructura similar a la de bacterias Gram negativas, cuenta con una membrana externa formada por una bicapa de fosfolípidos y por múltiples lipoproteínas, proteínas de sistemas de secreción además del LPS, seguido de un espacio periplásmico, peptidoglicano y a continuación la membrana citoplasmática o membrana interna. (Figura 1.2)^{3, 42, 43}

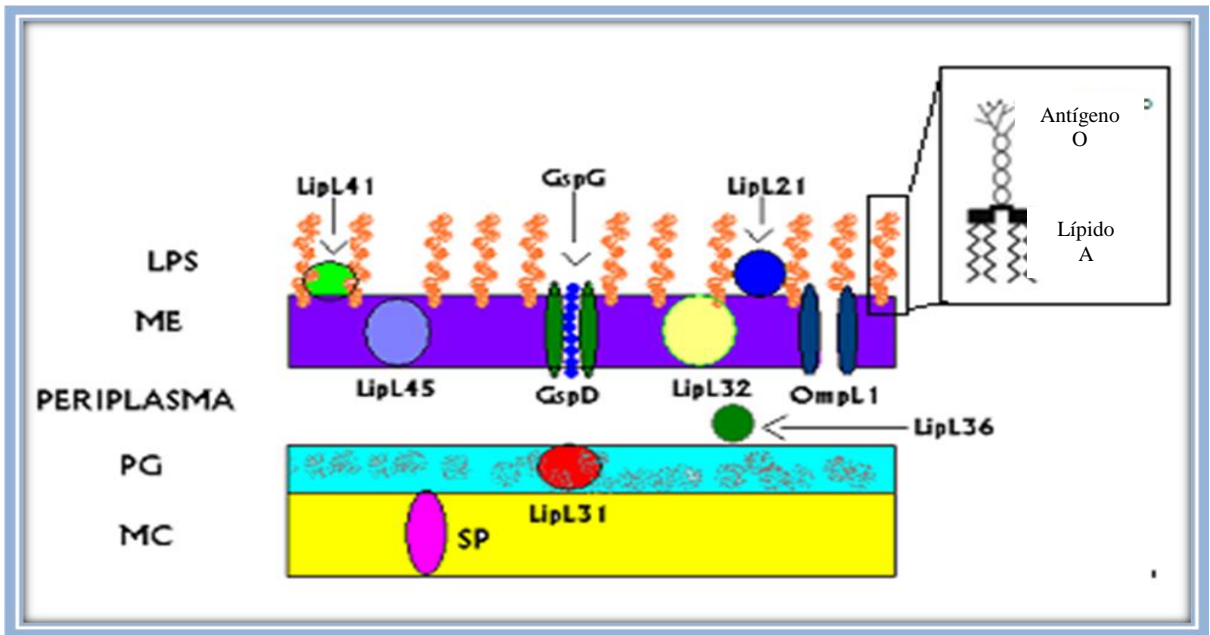


Figura 1.2 Estructura de membrana y pared celular: Membrana celular (MC), Peptidoglicano (PG), Espacio periplasmático, Membrana Externa (ME), Lipopolisacárido (LPS) Antígeno O, Lípido A y proteínas de membrana descritas en *Leptospira* Lipoproteínas; (LipL21, LipL31, LipL32, LipL36, LipL41 y LipL45); Proteína transmembranal (OmpL1), en su mayoría; del Sistema de Secreción tipo II (GspG, GspD), y Péptido Señal (SP). Adaptado de Rodríguez-Reyes 2007⁴² y Alcaráz-Sosa 2007⁴³

1.2.1.4 Lipopolisacárido (LPS)

Es el principal antígeno y es la base para las reacciones de Aglutinación Microscópica (AM).² También es llamado endotoxina y se trata de un fosfoglicolípido que se encuentra anclado a la membrana externa y por medio de uniones covalentes se une a un heterosacárido hidrofílico que se encarga de conferir la especificidad antigénica debido al arreglo del mismo. A pesar de su semejanza con el LPS de bacterias Gram negativas, el LPS de *Leptospira* tiene una actividad biológica hasta diez veces menor.^{44, 45, 46, 47}

En estudios recientes la atención se ha dirigido al estudio de la membrana externa debido a que es una estructura altamente conservada en cuanto a su exposición proteica en leptospiros patógenas. Contiene alrededor de 67 unidades proteicas de las cuales por lo menos 12 son producto de distintos genes; de estas existen 3 clases de proteínas: transmembranales, lipoproteínas y proteínas periféricas de la membrana (Figura 1.2).^{42, 48}

La porina OmpL1 (por sus siglas en inglés *Outer membrana protein*) forma parte de las proteínas transmembranales debido a que atraviesa la membrana externa. Las lipoproteínas son las más abundantes en la membrana externa: LipL32 es la más abundante, está ubicada en la superficie de la membrana externa; LipL36 ubicada en el periplasma; LipL48 inmersa en la membrana externa;

LipL 41 expuesta en la superficie; LipL21 expuesta en la superficie, es considerada como la segunda más abundante (Figura 1.2). Todas estas proteínas se encuentran ancladas a la membrana externa por medio de ácidos grasos que se encuentran sujetos a una cisteína amino-terminal. Otras proteínas de membrana externa tienen diversas funciones como: adhesinas, enzimas (termolisinas, metaloproteasas, esfingomielina, fosfolipasas, citocromo-oxidasa, peroxidasa, glucosa deshidrogenasa y colesterol oxidasa), proteínas transportadoras, proteínas de unión, así como toxinas que van a favorecer la virulencia.^{42, 48, 49, 50}

1.2.1.5 Desarrollo *in vitro*.

Los integrantes del género *Leptospira* son bacterias de aerobias a microaerófilas, microorganismos de desarrollo lento, capaces de sobrevivir en agua y tierras húmedas por largos periodos, para su aislamiento en el laboratorio son considerados microorganismos fastidiosos.³⁰ Metabólicamente, su principal fuente de carbono son los ácidos grasos de cadena larga (12-18 carbonos), los cuales son utilizados por la vía beta oxidativa para obtener su fuente de energía; contrario a otros microorganismos, no fermentan y los azúcares no pueden ser usados como fuente de carbono. Una vez utilizados los ácidos grasos requeridos para la nutrición y energía en el metabolismo de las leptospiras, se generan subproductos tóxicos, así que, para fines de desarrollo *in vitro* deben ser adicionados detoxificantes que los absorben y liberan lentamente a bajas concentraciones (Ej: fracción V de albúmina sérica bovina).^{51, 52}

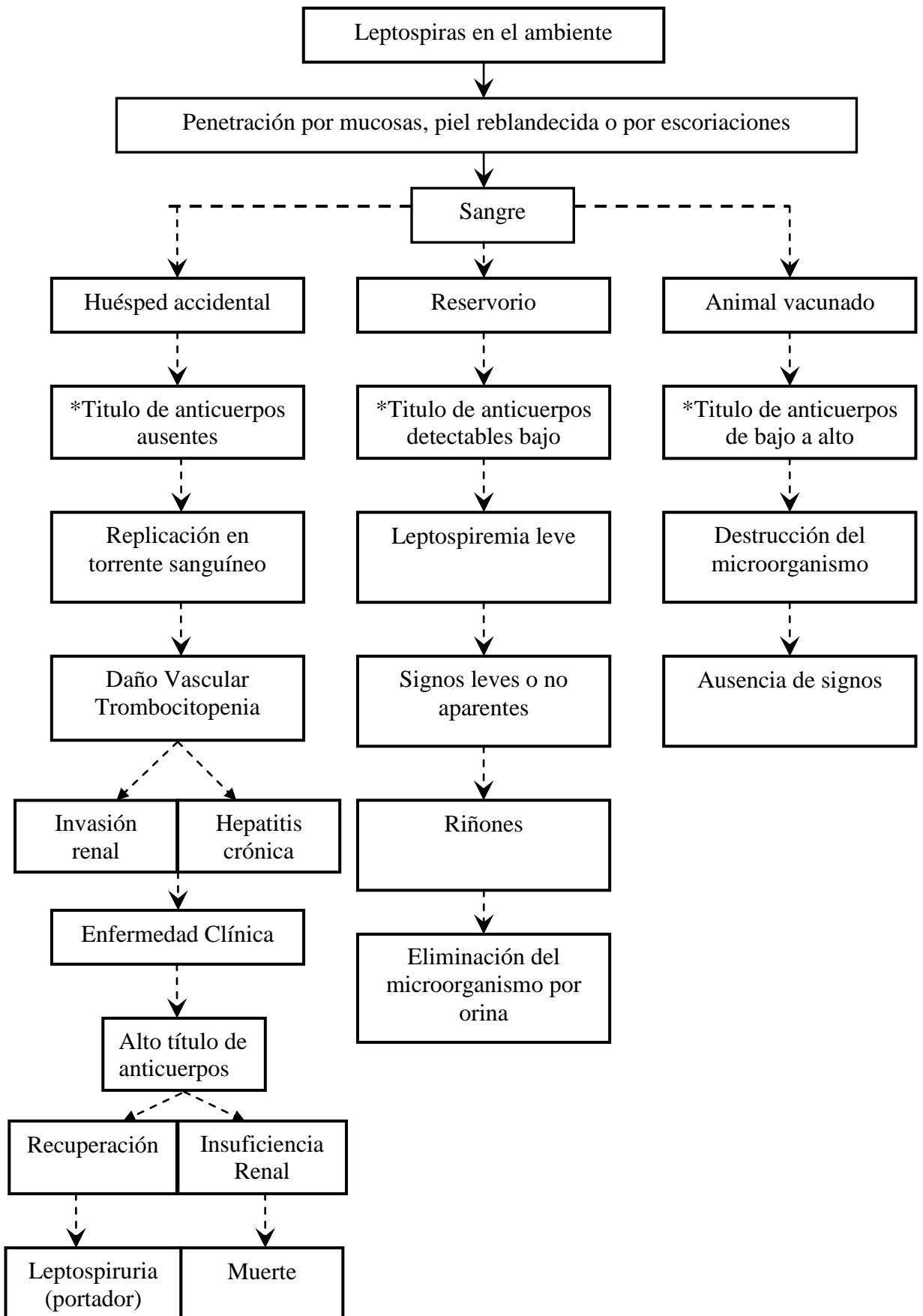
Las leptospiras *in vitro* pueden desarrollarse en medios semisólidos abundantes en proteínas como el medio Korthof, Fletcher o Stuart que son utilizados tanto en primo aislamientos como para mantener ceparios.⁵³ Después de 1 a 2 semanas, se produce una zona difusa de desarrollo cercana al extremo superior del tubo para después formar un anillo a un correspondiente al nivel de la tensión de oxígeno óptima para estos microorganismos, esta zona es conocida como “anillo de Dinger”.^{3, 51} Para su desarrollo *in vitro* el medio por elección es el EMJH (Ellinghausen, McCullough, Johnson and Harris),^{3, 51, 54, 55, 56, 57} donde la albúmina sérica bovina es usada como detoxificante y los ácidos grasos de cadena larga son adicionados en forma de un complejo de sorbitol (Tween). El glicerol en el medio acelera el desarrollo, mientras que el piruvato de sodio ayuda al desarrollo de algunas cepas cuando el inóculo es muy pequeño. Los iones de amonio son provistos como sales de amonio o por desaminación de aminoácidos y son la única fuente reconocida de nitrógeno. Además de requerir también cloruro de sodio, polisorbato, fosfatos, calcio, magnesio, hierro y vitaminas B1 (tiamina), B12 (cianocobalamina) Así mismo, la adición de calcio, magnesio y hierro, de igual

forma son esenciales.^{3, 51, 54, 55, 56, 57} El desarrollo *in vitro* en la cepas ya adaptadas a estas condiciones se puede observar en un lapso de 3 a 10 días obteniendo una concentración de 1×10^8 leptospiras/ml. En medio líquido el desarrollo se observa por turbidez, mientras que en medios como el EMJH semisólido el desarrollo es evidenciado por zonas de turbidez en forma de anillo de Dinger.^{3, 51} Para su desarrollo requieren además de un pH óptimo de 7.2 a 7.6 y son muy sensibles a los pH por debajo de 6.8^{55, 56} así como un rango de temperatura de 28 a 30° C para leptospiras saprófitas y patógenas; mientras que las especies saprófitas también tienen la capacidad de desarrollar en temperaturas de 11 a 13° C, capacidad con la que no cuentan las especies patógenas.^{54, 55, 56} Una vez que las cepas se han adaptado al cultivo *in vitro* las curvas de desarrollo bacteriano son semejantes a las de otros microorganismos con una fase lag, logarítmica y estacionaria, pero con escalas de tiempo mayores. La multiplicación de un espécimen patógeno es de 6-8 hrs, de donde una leptospira patógena logra un desarrollo de una unidad logarítmica en un día. Multiplicaciones similares se han reportadas en cepas de serovariedades adaptadas huésped.³

1.2.1.6 Patogenia

La bacteria ingresa al organismo a través de la piel escoriada o reblandecida por la humedad o por las mucosas oro-faríngeas, nasales, oculares y genital hasta alcanzar el torrente sanguíneo y distribuirse en los tejidos. El período de incubación es variable, de 5 a 14 días, con un máximo de 21, el microorganismo se replica en la sangre carente de anticuerpos, se difunde rápidamente y después de 48 horas se le encuentra en órganos como riñón, hígado, pulmón, corazón y músculo esquelético (fase leptospirémica de la enfermedad). Entre los días 5 y 7, los anticuerpos específicos formados favorecen la opsonización del microorganismo que desaparece del torrente sanguíneo para localizarse en túbulos contorneados renales y se inicia su excreción junto con la orina durante semanas o meses (fase crónica inmune o de leptospiruria) (Cuadro 1.4).^{3, 36} Dependiendo de la serovariedad y tipo de huésped (accidental o reservorio) será el daño ocasionado; por ejemplo *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo subtipo Hardjobovis produce infertilidad, agalactia y aborto en bovinos; *L. interrogans* serovariedades Canicola e Icterohaemorrhagiae se asocian con cuadros febriles, hemorragia, ictericia, insuficiencia renal y uremia (enfermedad de Stuttgart) en caninos y *L. interrogans* serovariedades Pomona y Bratislava producen infertilidad, aborto y nacimiento de lechones débiles en el ganado porcino así como infecciones en humanos (Cuadros 1.5 y 1.6). Las leptospiras son patógenos extracelulares, siendo su principal lesión la vasculitis (causada por exotoxinas o mediada por la respuesta inmune y anticuerpos específicos) (Cuadro 1.4) y la presentación clínica dependerá del o los órganos dañados.^{3, 58} (Cuadro 1.6)

Cuadro 1.4 Patogenia de la leptospirosis (adaptado de Green 1990).³⁶



* Título en Aglutinación Microscópica.

1.2.1.7 Inmunología

Las leptospiras patógenas son altamente invasivas debido a su motilidad característica y a la producción de enzimas como hemolisinas, fibrinolisin, lipasas, catalasa y hialuronidasa. Por lo tanto que tienen la capacidad de invadir ciertas regiones anatómicas difíciles de alcanzar como es el caso del líquido cefalorraquídeo y el ojo.⁵¹ Además de poseer un fuerte tropismo por el hígado y el riñón donde se adhieren al endotelio de los túbulos renales.^{51, 59, 60}

La respuesta inmunológica de tipo celular hacia este microorganismo está dada por la activación de la fagocitosis la cual ha sido poco estudiada y se considera que es mínima gracias a que dicho microorganismo posee un efecto citotóxico, resiste la acción del complemento, neutrófilos e induce la apoptosis en macrófagos.⁵¹

Sin embargo estudios realizados por Bolín *et al* 2001 demostraron que una vacuna monovalente logró evitar la colonización renal y la eliminación del microorganismo por la orina, mediante una potencial respuesta inmune celular en bovinos.⁶¹

La mayor parte de los estudios realizados basados en la respuesta humoral indican que, tras la primo infección, se produce una elevación de IgM, estas concentraciones son detectadas poco después de la desaparición del periodo febril, es decir después de la bacteremia, de 2 a 5 días después de la aparición de los signos en una enfermedad aguda. La respuesta inmune humoral es montada principalmente contra el LPS^{3, 16, 62, 63}

Los anticuerpos primarios van a dificultar la replicación de las leptospiras aunque no alcanzan a destruirlas; no es hasta la producción de IgG específicas que regulan la lisis de las leptospiras que serán destruidas.^{63, 64} El pico de IgM es alcanzado a las 3 ó 4 semanas post primo-infección mientras que las IgG tardan entre 4 y 12 semanas y tan sólo en unos días cuando hay un nuevo desafío por el mismo tipo de *Leptospira* (serovariedad). No hay inmunidad cruzada entre serovariedades.^{65, 66, 67}

En la fase de leptospiruria los niveles de IgM ya han descendido, por lo que puede ser que no se detecten en sangre. En cambio las IgG son abundantes por lo que llegan a detectarse aproximadamente en la semana 6 post-infección.⁶¹ Por otra parte se induce también una respuesta inmune de tipo local por lo que también se estimula una producción de IgA

1.2 MARCO REFERENCIAL

1.2.1 Epidemiología

Las leptospirosis patógenas muestran variaciones en su distribución mundial entre regiones, países, nichos ecológicos, especies animales afectadas, factores epidemiológicos y manifestación de las infecciones.¹ La leptospirosis es común en los climas húmedos tropicales, donde la cantidad de posibles huéspedes, sobrevivencia y transmisión directa o indirecta de la bacteria se ven favorecidos.¹ La prevalencia de las diferentes serovariedades se ve entonces directamente influenciada por ambiente local (geografía) y características poblacionales de reservorios, densidad de población y agregados (manadas, hatos, animales domésticos o silvestres), las cuales dependen de las condiciones de producción industrial, el tipo de prácticas agropecuarias, contacto directo e indirecto entre la fauna presente en el nicho ecológico (incluyendo al hombre) y el estado inmunológico de los posibles huéspedes.^{69, 70} Al centro del ciclo epidemiológico de la leptospirosis está el portador o excretor renal (leptospiras en túbulos renales), animales que se convierten en portadores crónicos de la bacteria que permite asegurar la continuidad del ciclo infeccioso.^{51, 58}

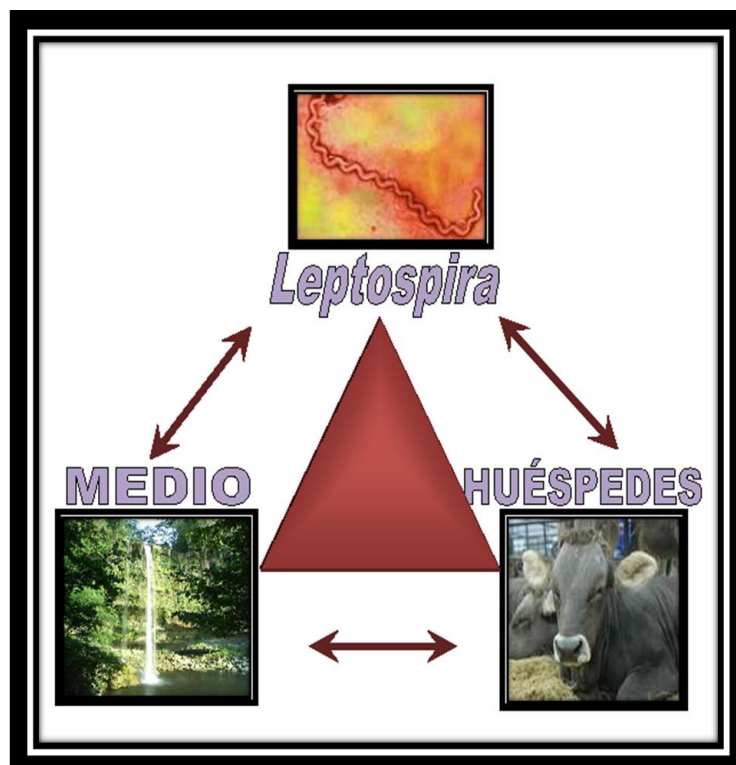


Figura 1.3 Triada epidemiológica en leptospirosis. El medio es el factor que interviene en el contagio entre el reservorio y el huésped accidental debido a la facultad que poseen las leptospirosis para sobrevivir en el mismo, así es como el reservorio excreta al microorganismo, este se mantiene en el medio ambiente y el huésped accidental es infectado.³

1.3.1.1 Factores ambientales

Esta bacteria tiene una alta supervivencia en climas húmedos tropicales y en suelos lodosos, un suelo moderado en alcalinidad, así como temperaturas ambientales alrededor de 10 a 25 °C, pueden favorecer que las leptospiras sobrevivan por largos periodos, desde unos cuantos días hasta varias semanas en agua estancada y áreas húmedas. Por esta razón la incidencia de leptospirosis aumenta durante la temporada de lluvia en presencia de inundaciones.³

1.3.1.2 Factores del hospedero

Estos factores son dependientes del individuo que se infecta y van directamente relacionados con la serovariedad con la que tenga contacto, por lo cual tenemos dos tipos de hospederos: **el huésped común o reservorio** que cursa con un cuadro subclínico la mayoría de las veces y mantiene y excreta las leptospiras al medio ambiente por un largo periodo, siendo específica la relación serovariedad-especie animal; y el **huésped accidental** que es aquel que se infecta y cursa con la enfermedad de una forma más severa llegando a causar la muerte. La signología de igual forma depende de la serovariedad y la especie (Cuadros 1.5 y 1.6). Una especie animal puede ser reservorio de más de una serovariedad o bien, diversas especies animales funcionan como reservorios para una serovariedad.⁷¹

1.3.1.2.1 Huésped común o reservorio

Se considera huésped común aquella especie animal que por sí sola puede mantener una determinada población de agentes infecciosos, sin la intervención de huéspedes accidentales.⁷²

Los reservorios más importantes son los roedores que pueden transmitir la enfermedad a otros animales domésticos tanto en el medio rural como en el urbano (Cuadro 1.5).^{1, 3} Estos mantienen en sus túbulos renales a las leptospiras las cuales proliferan y son excretadas con la orina durante largos periodos, incluso de por vida. Epidemiológicamente tiende a manifestarse en forma endémica, con una alta prevalencia, pero baja patogenicidad, es decir muchos animales están infectados pero pocos manifiestan signos clínicos, debido a que el daño renal es poco severo.^{3, 73, 74}

Suelen ocurrir problemas de fertilidad en hembras jóvenes; a nivel serológico hay muchos animales reactivos pero con títulos bajos en la prueba de AM.^{3, 73, 74}

1.3.1.2.2 Huésped accidental

La mayoría de las especies pueden infectarse de todas las serovariedades de forma accidental aunque existen algunas más características de cada especie. En el caso particular del hombre todas las serovariedades pueden infectarlo considerándose huésped accidental de todas ellas (Cuadros 1.5 y 1.6). La infección en un huésped accidental se manifiesta en brotes o epidemias, baja prevalencia en la población general, pero donde los animales infectados manifiestan diversas patologías en general en forma aguda y asociadas al daño por septicemia y vasculitis (Ej: hemoglobinuria, anemia hemolítica, hepatitis, nefritis, placentitis, mastitis), excreción renal de poca duración y altos títulos aglutinantes en la AM.^{58, 64,75, 76} El huésped accidental juega un papel de menor importancia en el ciclo epidemiológico de la leptospirosis.⁵¹

Cuadro 1.5 Relaciones epidemiológicas de serovariedades de *Leptospira* en diferentes especies animales. ^{2, 3, 16, 31}

ESPECIE	SEROVARIEDAD	ESTADO
BOVINO	Hardjobovis	Huésped común
	Hardjoprajitno	
	Pomona	Huésped accidental
	Canicola	
	Grippotyphosa	
	Icterohaemorrhagiae	
CERDO	Tarassovi	Huésped común
	Pomona	
	Bratislava	
	Canicola	Huésped accidental
	Icterohaemorrhagiae	
PERRO	Canicola	Huésped común
	Pomona	Huésped accidental
	Icterohaemorrhagiae	
	Hardjobovis	
CABALLO	Bratislava	Huésped común
	Pomona	Huésped accidental
	Icterohaemorrhagiae	
	Grippotyphosa	
RATON	Ballum	Huésped común
RATA	Icterohaemorrhagiae	Huésped común
	Ballum	
	Copenhageni	
	Pomona	Huésped accidental
MAPACHE	Grippotyphosa	Huésped común
LOBO MARINO	Canicola	Huésped accidental
	Pomona	
CIERVO	Hardjobovis	Huésped común
	Pomona	Huésped accidental
	Copenhageni	
	Roumanica	
HOMBRE	Cualquiera	Huésped accidental

1.3.1.2.3 Factores del agente

El hábitat natural de las leptospiras patógenas son los túbulos renales de los animales que sirven como reservorios o como huéspedes comunes.³¹ *Leptospira* es sensible a la desecación y a la luz, cuando es expuesta a temperaturas de 56°C mueren con facilidad. Contrario a esto, pueden sobrevivir hasta por 45 días en congelación y temperaturas de hasta -30° C. Por otro lado, hay una gran variedad de sustancias que destruyen a las leptospiras, como es el caso del fenol 5%, formol 0.5%, ácido clorhídrico 2%, hidróxido de sodio 2%, ácido sulfúrico 0.05%, cresoles 5%; así como sustancias orgánicas como el jugo gástrico, jugo pancreático y bilis tienen la capacidad de inactivar a las leptospiras, no así la saliva en la cual pueden permanecer viables de 2 a 12 horas.^{3, 31,51}

1.3.2 Zoonosis

La leptospirosis es reconocida como la zoonosis más difundida en el mundo.^{2, 77} Es un problema de salud pública debido a que el humano es un hospedero accidental de *Leptospira*, considerada una enfermedad ocupacional de agricultores, ganaderos, trabajadores de mataderos, trabajadores de alcantarillado, plomeros, médicos veterinarios, bomberos y personal de laboratorios, entre otros.

La principal vía de infección para los humanos es el contacto directo o indirecto con la orina de los animales infectados como es el caso de agua contaminada con tal orina.²

1.3.3 Presentación clínica

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa y contagiosa, causada por serovariedades patógenas de *Leptospira*.⁷⁸ Diversos síndromes clínicos han sido reconocidos desde subclínicos hasta nefritis intersticial y síndrome hemolítico, pero la mayor parte de la leptospirosis en animales se asocia al estado subclínico de portador renal. Las manifestaciones de leptospirosis en los animales son más claras cuando son entendidas con base en la relación entre el huésped (especie animal) y las serovariedades presentes en su nicho ecológico.

Los factores de patogenicidad bacteriana pueden ser similares entre serovariedades, no así la presentación clínica, la cual está ligada a la relación serovariedad: huésped y su condición inmunológica, en el hombre siempre se considera como infección accidental (Cuadros 1.4, 1.5 y 1.6).^{3, 16, 31, 33, 36, 51,}

Cuadro 1.6. Ejemplos de clasificación epidemiológica, presentación clínica y principales lesiones en leptospirosis por serovariedad.^{58, 70}

ESPECIE	SEROVARIEDAD	SIGNOS Y LESIONES
BOVINO	Ballum	Debilidad, sinología nerviosa.
	Canicola	Ictericia y petequias en hígado, infiltración linfocítica portal, necrosis centrilobular, hemosiderosis esplénica.
	Grippotyphosa	Ictericia y petequias en hígado, infiltración linfocítica portal, necrosis centrilobular, hemosiderosis esplénica. Disociación celular hepática, colangitis, hemosiderosis y congestión esplénica. Desorganización epitelial de túbulos renales.
	Hardjobovis	Nefritis intersticial, Lesiones blanco grisáceas en parénquima renal. Células epiteliales y tubulares, vacuoladas, encogidas o granuladas, rodeados por masas de leucocitos, linfocitos y células plasmáticas.
	Icterohaemorrhagiae	Ictericia y petequias en hígado, infiltración linfocítica portal, necrosis centrilobular, hemosiderosis esplénica.
	Pomona	abortos y nacidos muertos, prematuros o débiles
	Tarasovi	Nefritis intersticial crónica. infertilidad, abortos, agalactia, mortinatos, hemoglobinuria, anemia hemolítica, nacimientos prematuros, crías débiles.
CERDO	Bratislava	Nefritis intersticial en animales de abasto. Fiebre moderada, anorexia, depresión, hemoglobinuria, ictericia. Abortos en hembras jóvenes y nacidos débiles.
	Canicola	Fetos momificados, nacidos muertos o débiles con sufusión pleural color paja; petequias en pleura, epicardio, corteza renal; hígado y riñones hinchados y oscuros; focos necróticos en hígado. Hepatitis aguda, miocarditis focal.
	Copenhagenii	Anemia hemolítica, hemoglobinuria, hepatitis, ictericia. Necrosis focal hepática en fetos y lechones hemorragias, hematemesis, melena, epistaxis y petequias en serosas, mucosa oral y nasal; encogimiento y disociación de células hepáticas, con núcleo hiperocrómico y citoplasma granular eosinofílico; necrosis del parénquima hepático; células de Kupffer con hemosiderina y vasos portales congestionados.
	Pomona	Fiebre moderada, anorexia, depresión, hemo-globinuria, ictericia. Abortos y nacidos débiles.
	Tarasovii	Fetos momificados, nacidos muertos o débiles con sufusión pleural color paja; petequias en pleura, epicardio, corteza renal e hígado (hepatitis aguda y focos necróticos), riñones hinchados y oscuros, miocarditis focal. Meningitis, hemoglobinuria, daño renal, mastitis, abortos, nacimientos prematuros y momificaciones
PERRO	Australis	Hepatitis crónica, lesión renal.
	Bratislava	Abortos, nefritis, falla renal aguda, úlceras en el tracto digestivo anterior, nefritis intersticial crónica.

	Canicola	En general presentación subclínica. Engrosamiento de riñones con hemorragias y petequias, falla renal, lesiones en forma de cuña en unión corticomedular, nefritis intersticial crónica, degeneración de tubular e infiltrado mononuclear y en ocasiones neutrófilos.
	Gryppytyphosa	Hepatitis crónica activa, fibrosis peri-biliar, desacomodo lobular con fibrosis irregular úlceras en el tracto digestivo anterior; nefritis intersticial crónica Engrosamiento hepático, esclerosis, ascitis atrofia, fibrosis, hiperplasia nodular.
	Icteroahemorrhagiae o Copenhagenii	Fiebre, ictericia, hemoglobinuria, hemorragias, síndrome urémico. De degeneración hidrópica a necrosis epitelial de los túbulos renales, edema intersticial con infiltración leucocitaria difusa, esclerosis y fibrosis intersticial focal, fibrosis peri-glomerular de membrana basal y cápsula de Broman. Linfonodos y bazo aumentados de tamaño, con edema y hemorragias, linfopenia, reticulocitosis. Hemorragia difusa en mucosa gástrica asociada con necrosis, infiltración neutrofílica y descamación de mucosa.
	Pomona	Úlceras en el tracto digestivo anterior; nefritis intersticial crónica. Cuatro síndromes: agudo hemorrágico, crónico urémico, crónico icterico y abortivo.
CABALLO		Abortos, infertilidad, agalactia, hemoglobinuria y uveítis recurrente. (forma crónica)
ROEDOR		Pérdida de peso, postración, nefritis intersticial, neumonía hemorrágica, hepatitis.

1.3.4 Diagnóstico

La leptospirosis puede ser diagnosticada por aislamiento, inmunofluorescencia, detección de ácidos nucleicos (PCR) o serología, esta última en particular apoyada por datos epidemiológicos. El diagnóstico para la leptospirosis suele ser confuso y complicado debido a la complejidad de su presentación clínica, así como las múltiples serovariedades que existen en la naturaleza (Cuadros 1.3 y 1.5).

El diagnóstico definitivo de leptospirosis es el aislamiento.^{79, 80} Sin embargo, la eficiencia del cultivo a partir de una muestra clínica es menor al 20%.³ Debido a que son microorganismos de desarrollo *in vitro* lento y fastidioso, sumado a que la prevalencia de infección activa en una población o hato es baja (excepto en situación de brote), hace al aislamiento impráctico como método diagnóstico.⁵³

Para su diagnóstico tenemos las pruebas indirectas que se basan en evidenciar la unión antígeno-anticuerpo mientras que las técnicas directas consisten en la observación del microorganismo o detección de su material genético (Cuadro 1.7).^{79,80}

El diagnóstico presuntivo de leptospirosis proviene de la detección de anticuerpos específicos (seroconversión) mediante pruebas serológicas como ELISAs o AM, siendo esta última la herramienta diagnóstica más utilizada y reconocida como estándar.^{79,80}

1.3.4.1 Pruebas Indirectas

Las pruebas serológicas son las de uso más frecuente para orientar o confirmar el diagnóstico clínico así como para determinar la prevalencia de hato o para monitoreo epidemiológico de poblaciones.^{79,80}

La realización del diagnóstico por estas técnicas se basa principalmente en la medición de la respuesta inmune-específica del huésped frente a la exposición de la bacteria. Los anticuerpos séricos anti-leptospira aparecen unos días después de la primo-infección y pueden persistir durante semanas, meses o años; cuando el individuo es un huésped accidental estos anticuerpos alcanzan títulos altos con rapidez y no perduran por largos periodos. En tanto, cuando el individuo infectado es un reservorio, con infección crónica, los títulos de anticuerpos son bajos en forma constante,^{79,80} lo cual implica problemas para interpretar los resultados ya que hay diversos factores que pueden alterar la lectura como es el uso de vacunas o bien que el animal se encuentre en una fase muy temprana de la enfermedad (antes de 7 ó 10 días), en donde no es posible identificar anticuerpos aglutinantes. Para evitar estos problemas se recomienda la realización de la prueba en forma pareada, esto es, tomar otra muestra al día 14 buscando un incremento en cuatro veces el título inicial, lo que es reconocido como un diagnóstico serológico positivo a leptospirosis.³

Existen diversas pruebas serológicas para el diagnóstico de leptospirosis (Cuadro 1.7), las cuales tienen un alcance diferente para determinar género, serogrupo o serovariedad infectante. Para el diagnóstico en medicina veterinaria ELISA y la AM son las pruebas más utilizadas, donde la primera detecta en general a nivel de género, en tanto la segunda a nivel de serovariedad.³

La prueba de AM, consiste en enfrentar diluciones del suero contra un antígeno conocido de las serovariedades más comunes y de esta forma establecer el punto en el cual la aglutinación es evidente mediante microscopía de campo oscuro (CO); es decir existe una unión entre el antígeno

y el anticuerpo. Esta prueba sigue siendo la prueba de referencia a pesar de las desventajas que tiene, como por ejemplo el alto costo para el mantenimiento de las cepas viables; es una técnica muy laboriosa debido a que se requieren hasta 5 o más diluciones por serovariedad para establecer la última dilución donde encontramos aglutinación (a lo que llamamos título); además de ser necesario que la persona que realice dicho diagnóstico sea una persona experimentada para lograr una interpretación adecuada del resultado.⁸¹

Los ensayos inmuno-enzimáticos (ELISA) también se basan en la detección de la unión de antígeno-anticuerpo, existen diversos tipos de ELISAs

ELISA Directa. Es la detección de un antígeno por medio de un conjugado de inmunoglobulinas marcadas con una enzima y la adición de un sustrato sin intermediarios dando como resultado un cambio en el color detectado mediante un espectrofotómetro.^{82,83, 84}

ELISA Indirecta.- La finalidad de ésta es el reconocimiento de los anticuerpos específicos, en un suero problema, fijando los antígenos de captura los cuales serán reconocidos por los anticuerpos circulantes específicos, que al quedar unidos al antígeno serán detectados por un anticuerpo secundario conjugado con una enzima (conjugado de inmunoglobulinas) y que será revelado por el sustrato, evidenciándose una reacción positiva con un cambio colorimétrico. (Figura 1.4)^{82, 83, 84}

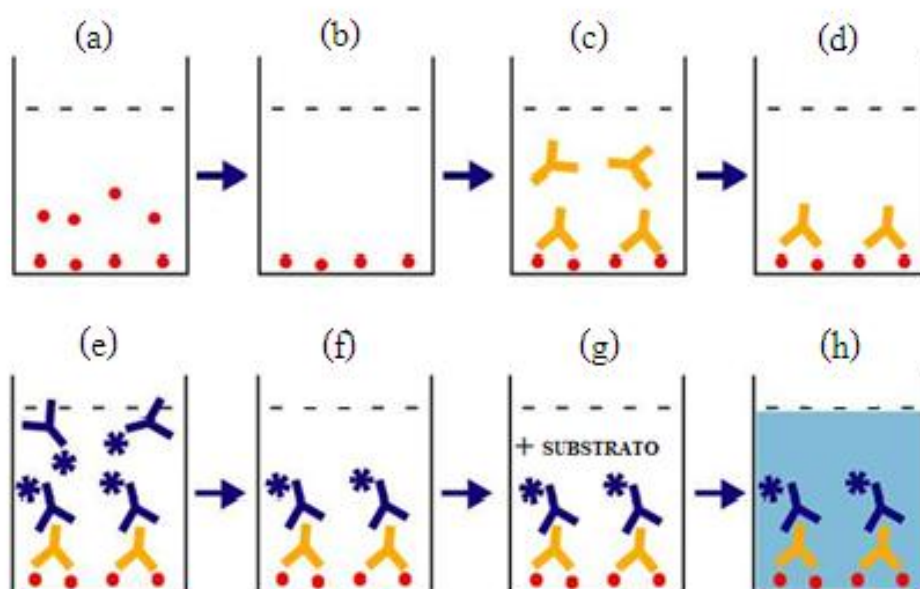


Figura 1. 4.- Diagrama de un inmunoensayo indirecto en donde: **a)** y **b)** corresponden a la fase sólida, **c)** y **d)** a la unión del antígeno con el anticuerpo específico, **e)** y **f)** unión del conjugado, **g)** adición de sustrato y **h)** reacción colorimétrica. Modificado de microvet.arizona.edu/.../ToolBox/elisa3.jpg.

Esta técnica ha sido desarrollada en diversos modelos para el diagnóstico de leptospirosis utilizando diferentes antígenos como proteínas recombinantes (LipL32, LipL36, LipL41),⁸⁵ de LPS, o bien mezclas de algunas serovariedades,⁸⁶ con anticuerpos en el conjugado de tipo IgG o IgM.^{2, 77, 87}

ELISA Sándwich.- En ésta se utilizan anticuerpos contra antígenos específicos fijados en la placa en la fase sólida y un anticuerpo marcado (conjugado de inmunoglobulinas). En esta técnica lo que se pretende es evidenciar la presencia del antígeno.^{82, 83, 84}

ELISA Competitiva.- Es utilizada para la detección de antígenos para lo cual se utiliza un anticuerpo específico, el antígeno desconocido y otro antígeno marcado correspondiente al anticuerpo utilizado, en este caso una lectura positiva no da un cambio colorimétrico, debido a que el antígeno problema no está marcado.^{82, 83, 84}

1.3.4.2 Pruebas Directas

Microscopia de Campo Oscuro. La observación directa de leptospiras puede realizarse directamente en orina, por medio de un microscopio de campo oscuro aunque esta técnica es muy inespecífica debido a que diversas estructuras pueden confundirse con leptospiras razón por la cual sólo podemos decir que se observan formas “similares a leptospira”. En tejidos puede realizarse la observación mediante tinciones argénticas, inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.^{43, 81}

Cultivo.- Este es el método definitivo para el diagnóstico de leptospirosis. La realización del aislamiento se hace a partir de orina, sangre, líquido cerebro-espinal y tejidos blanco como riñones pulmones o hígado. Aunque esta técnica es poco práctica debido a que el aislamiento puede tardar de 8 a 20 semanas o más. El éxito de esta técnica depende del grado de infección así como la etapa en la que se encuentre la enfermedad y sólo después de por lo menos 6 meses podemos dar un diagnóstico negativo. Además se requieren características específicas de la muestra, como lo es inocular casi de inmediato de coleccionar la muestra en esterilidad y con medios de cultivo adicionados con inhibidores como 5-fluracilo (5-FU), todo esto convierte a la técnica muy cara y poco práctico como método diagnóstico rutinario.^{3, 43, 82} Por otro lado la identificación de los aislados de *Leptospira* requiere procedimientos complejos desde la aglutinación cruzada con sueros inmunes de referencia³; pasando por el polimorfismo de restricción;⁸⁸ polimorfismo de los elementos de inserción IS 1533.⁸⁹ Hasta la técnica de MLST.^{90,II}

^{II} www.mlst.org

Cuadro 1.7 Comparativo de diagnóstico de leptospirosis. ^{3,51}

Tipo	Prueba		Muestra	Nivel de detección	
Detección directa	Cultivo	<i>In vivo</i> en animales de laboratorio	Macerado de riñón, hígado de animales infectados	Género	
		<i>In vitro</i> en medios específicos	Macerado de riñón, hígado, orina, sangre y líquido cefalorraquídeo	Género, especie y serovariedad	
	Inmuno-histoquímica	Peroxidasa	Tejidos/ Orina	Género	
	Inmuno-fluorescencia	Fluorescencia			
	Microscopía	Campo oscuro Electrónica			
	Histopatología	Warthin-Starry y métodos Van Orden	Tejidos Observar al microorganismo		
		Hematoxilina/eosina, Giemsa	Lesión con infiltrado linfoplasmático/ microorganismo		
	Detección de ADN	PCR En general solo género		Tejido, fluidos, cultivos	Género/ especie
Hibridación de ADN		Cultivos			
Detección indirecta (Serología)	ELISA	Indirecta	IgM	Suero	Género
		IgG			
		Competitiva	IgG		
		Dot	IgM	Orina	
	Aglutinación	Macroscópica	IgG	Suero	Género y serovariedad
		Microscópica	IgG/ IgM		
Látex		IgG			
Fijación del complemento	IgG				

1.3.5 Prevención y control.

La prevención y el control de la leptospirosis son complejos para lo cual se requiere establecer programas específicos. Para la correcta realización de un programa de prevención y control es vital tener un amplio conocimiento de la historia natural de la enfermedad así como su cadena epidemiológica y la situación de seroprevalencia de la región. Esto es, conocer la localización, frecuencia de casos y tipo de infección. La identificación oportuna de un brote de leptospirosis es de mucha ayuda para el control de dicha enfermedad, para lo cual es indispensable contar con el apoyo de estudios serológicos de la población debido a que el diagnóstico clínico es difícil por la variedad de signos y lesiones (Cuadro 1.6). Si es detectado un brote se debe de realizar una adecuada cuarentena de los animales infectados además de un lavado a fondo con detergentes y una correcta desinfección con yoduros en instalaciones.

Es necesario mantener un programa de control de fauna silvestre y sobre todo de la fauna nociva en particular de roedores y perros.

En caso de infección se debe comenzar de manera profiláctica con quimioterapéuticos como la administración de dihidroestreptomomicina, desde 10 a 25 mg/kg, amoxicilina a 15 mg/kg o el uso de penicilinas 25,000 – 40,000 UI/kg en casos tempranos ha dado buenos resultados. La prevención en el hombre se basa en la utilización adecuada de implementos de protección en trabajos de alto riesgo como lo es el uso de botas de hule, utilización de gafas, guantes, dependiendo del trabajo que se realice. Para el tratamiento en el hombre se recomienda la utilización de doxiciclina a 5 mg/kg.^{3,}

36

La inmunización es otro método que ayuda al control, las bacterinas que se emplean son una suspensión de *Leptospiras* inactivadas compuesta por varias serovariedades, el tipo de serovariedades utilizadas en la bacterinas se relaciona con la situación epidemiológica del lugar, así como la especie en la cual se va a aplicar, la inmunidad que proporcionan las bacterinas es de tipo humoral específica para el LPS es decir específica de serovariedad.

Los beneficios económicos de la utilización de bacterinas son mucho mayores a las pérdidas que pueden existir al bajar la producción o bien al tener abortos.^{3, 36}

1.3.6 Normatividad

Existen diversas normas oficiales las cuales se encargan de regular aspectos sobre la producción de vacunas, medidas preventivas y de control en el humano así como la clasificación correspondiente de la leptospirosis para su notificación.

Norma Oficial Mexicana NOM-029-SSA2-1999, Para la Vigilancia Epidemiológica, Prevención y Control de la Leptospirosis en el Humano. Esta Norma tiene como objeto establecer las medidas preventivas, de control y de vigilancia epidemiológica de la leptospirosis en el humano, es obligatoria en todo el territorio nacional para todo el personal de salud en los establecimientos de atención médica, públicos, sociales y privados del Sistema Nacional de Salud.⁹¹

El acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos aprobado el 21 de septiembre de 1994 y actualizado el 5 de marzo de 1999, acordaron que la leptospirosis se encuentra en el grupo 3, que está constituido por aquellas enfermedades que se encuentran presentes en territorio nacional consideradas como enzoóticas pero que representan un menor riesgo desde el punto de vista epidemiológico, económico, de salud pública y de comercio nacional e internacional son de notificación mensual obligatoria a las autoridades competentes de sanidad animal del país.⁹²

Por otro lado, la Norma Oficial Mexicana NOM-038-ZOO-1995. Requisitos mínimos para las bacterinas empleadas en la prevención y control de la leptospirosis bovina. La presente Norma es de observancia obligatoria en todo el territorio nacional es aplicable a todas las bacterinas que se comercializan y emplean en la prevención y control de la leptospirosis bovina.

La vigilancia del cumplimiento de esta le corresponde a la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGARPA) y a los gobiernos de los estados, en el ámbito de sus respectivas atribuciones y circunscripciones territoriales, de conformidad con los acuerdos de coordinación respectivos. Actualmente, dicha norma se encuentra bajo revisión técnica.⁹³

CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN,

HIPÓTESIS Y

OBJETIVOS

*"La confianza en sí mismo es el
primer secreto del éxito".
Ralph Waldo Emerson.*

2.1 JUSTIFICACIÓN

La técnica de diagnóstico de leptospirosis más utilizada es la AM, la cual detecta anticuerpos después de los 10 días post-infección. La observación directa del organismo, es posible utilizando un microscopio de campo oscuro, pero requiere de experiencia y cargas bacterianas mínimas de 1×10^5 /ml para lograr su detección, además de que es fácil confundir restos de fibrina con leptospiras (pseudoleptospiras) por lo que este método es considerado de baja sensibilidad y especificidad.⁹⁴ El aislamiento bacteriológico directo es el método definitivo de diagnóstico de la infección, sin embargo, es costoso, lento, poco eficiente y por lo tanto impráctico.⁸¹ Por otro lado, la técnica de ELISA propuesta puede detectar anticuerpos anti-leptospira del tipo IgG con mayor sensibilidad que la prueba estándar de AM. La ELISA también ofrece la ventaja de su simplicidad una vez estandarizada, así como la capacidad de evaluar un número elevado de muestras en forma simultánea.

Con base en lo anterior se propone en este trabajo de tesis, evaluar y comparar con la AM la técnica de ELISA, utilizando membranas externas de *Leptospira* y leptospiras completas como antígenos de captura, lo que resultará en el establecimiento de una prueba diagnóstica alternativa a la AM.⁸⁶

2.2 HIPÓTESIS

Debido a que la técnica de ELISA es altamente sensible será útil como herramienta diagnóstica para la detección de Leptospirosis y una alternativa a la técnica de aglutinación microscópica.

2.3 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar, estandarizar, evaluar y probar un ensayo inmuno-enzimático para el diagnóstico de leptospirosis en bovinos con *Leptospira interrogans* serovariedad Hardjoprajitno mediante la utilización de leptospiras completas o extractos de membrana externa como antígenos de captura y sueros de bovinos provenientes de una zona endémica, previamente evaluados por aglutinación microscópica, que sirva como una prueba diagnóstica alternativa y complementaria para la detección de leptospirosis en bovinos.

2.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener cultivos de *L interrogans* serovariedad Hardjo (Hardjoprajitno) y sus extractos de membrana obtenidos por medio de detergente tritón 114 para utilizarlos como antígeno de captura en el ELISA, así como para la inmunización de conejos.
2. Obtener sueros de conejos no inmunizados e inmunizados con leptospiras completas o extractos de proteínas de membrana externa para utilizarlos como testigos negativos y positivos en la estandarización de la prueba de ELISA.
3. Estandarizar la prueba de ELISA mediante el uso de diferentes concentraciones de los antígenos de captura frente a diferentes diluciones de sueros testigo de conejos y con los parámetros obtenidos establecer las condiciones de trabajo con sueros de bovinos.
4. Evaluar los resultados de la prueba de ELISA por medio de métodos estadísticos y compararlos con los obtenidos de aglutinación microscópica de una muestra de 100 bovinos con exposición natural y sin historia de inmunización contra *Leptospira*.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y

MÉTODOS

*"Lo verdadero es demasiado sencillo, pero siempre se llega a ello por lo más complicado".
George Sand.*

3.1 Cultivo bacteriano

Se cultivó en medio líquido Ellinghausen & McCullough y modificado por Johnson & Harris (EMJH) (Johnson and Harris, 1967), suplementado con 1% de albúmina sérica bovina (ABS) en frascos de 100 ml. (Ver Apéndice 1) La cepa de *Leptospira interrogans* Hardjo serovariedad Hardjoprajitno, proporcionada por el Centro de Referencia e Investigación sobre Leptospirosis OMS/FAO^I la cual se mantuvo en incubación^{II} a 30°C durante 8 a 12 días hasta obtener una cuenta aproximada de 2×10^8 células/ml medido en una cámara de Petroff-Häusser.⁸¹

3.2 Técnicas moleculares

3.2.1. Extracción de la membrana externa

Se realizó a partir de 100 ml de un cultivo de *L. interrogans* serovariedad Hardjo (Hardjoprajitno) con una cuenta aproximada de 2×10^8 leptospiras/ml a través del método de Tritón X-114 descrito por Cullen *et al* 2003 modificado por Matsunaga que a continuación se explica brevemente.^{42, 95, 96,}

97

3.2.1.1 Extracción de Material Completo

Los 100 ml de cultivo se centrifugaron a $7,000 \times g$ ^{III} durante 10 minutos en tubos Nalgene ® estériles a una temperatura 4° C la pastilla se resuspendió en 10 ml de PBS-5mM MgCl₂ frío (Ver Apéndice 1) y fue distribuido en tubos Ependorff ® de 1.7ml, se centrifugó nuevamente a $7,000 \times g$,^{IX} durante 10 minutos a 4°C y el sedimento se resuspendió en un total de 450 µl de 2x TNE-PI (Inhibidores de proteasas) frío + 450 µl de agua destilada manteniéndose en hielo. (Ver Apéndice 1)

La pastilla fue resuspendida en 100 µl de 1x amortiguador final de muestra (AFM) y 0.25 mM de inhibidor de proteasas fluoruro de fenil-metil sulfonilo (PMSF) (*Sigma*) (Ver Apéndice 1) y fué almacenado a -20 °C hasta su uso. Este material corresponde al paquete celular completo.^{42, 95, 96, 97}

^I WHO/FAO/OIE Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis,

^{II} Precision Scientific CO Mod 4 EUA

^{III} Rotor Jouan 0.600 KG RPM tr/mn 11,500 MAXI

3.2.1.2 Separación de membrana externa en fase acuosa y detergente.

Para la separación de la fase detergente y la acuosa se adicionaron a los tubos con el sobrenadante del paso anterior, 100 µl de tritón X-114 (ICN grado proteína) al 10% frío, se mantuvo en agitación durante 30 min. a 4°C, y se centrifugó durante 10 min a 9,000 xg^X (se transfirió el sobrenadante a un tubo con 20 µl de 1M CaCl₂, se recuperó un volumen de 100 µl de la denominada fracción de extracción detergente y fue colocado en un tubo y se conservó a -20°C como muestra, para analizar posteriormente.

El volumen restante del sobrenadante de cada tubo fue mezclado con otros 100 µl de Tritón X-114 frío al 10% (grado proteína).

La mezcla anterior se incubó a 37°C durante 10 min para separar la fase detergente (botón) de la fase acuosa (sobrenadante). El material soluble en tritón (sedimento) fue centrifugado a 2,000 xg^X a temperatura ambiente (TA) durante 10 min.

Se transfirió la fase acuosa (FAC) correspondiente al sobrenadante, en un nuevo tubo de microcentrífuga, dejando la fase de detergente (FDet) en el mismo tubo.^{42, 95, 96, 97}

3.2.1.3 Lavado de las fracciones

A la FAC se adicionaron 200 µl de Tritón X-114 frío al 10%. A la FDet se adicionaron 800 µl de 1X TNE-PI frío. (Ver Apéndice 1) Ambas fases FAC y de FDet fueron Incubadas a 37 °C durante 10 min^{VIII} y centrifugadas a 2,000 xg^{IV} a TA durante 10 min.

El sobrenadante de la FAC se transfirió a nuevos tubos. Y se eliminó el sobrenadante de la FDet y se recuperó el contenido del fondo es decir la pastilla.^{42, 95, 96, 97}

3.2.1.4 Precipitación con acetona

Se adicionaron 1 y 3 volúmenes de acetona (grado reactivo) fría a las FAC y FDet respectivamente, se homogenizaron en un agitador para tubos^V y, se mantuvieron en agitación orbital^{VI} a 4°C durante toda la noche.^{42, 95, 96, 97}

Al siguiente día se centrifugaron a 13,000 xg^X durante 15 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante de ambas fases, dejando secar ambos tubos perfectamente y se resuspendió cada pastilla en 100 µl de

^{IV} Rotor Savant model RSR-20 13,000 x g

^V Vortex Thermolyne Maxi Mix Plus M63215

^{VI} Dual Action Shaker Mod 3508

amortiguador final de muestra (AFM-0.25 mM PMSF). (Ver Apéndice 1) y se almacenó a -20°C hasta su uso.^{42, 95, 96, 97}

3.2.1.5 Visualización de las proteínas de las fases acuosa y detergente:

Una vez obtenidas las fases se visualizan las proteínas para corroborar su existencia mediante la utilización de un gel de poliacrilamida (PAGE) utilizando corriente eléctrica para la separación de las proteínas (electroforesis vertical).

Para lo que se preparó un gel de poliacrilamida-SDS al 12% (gel separador), de 0.75 mm de espesor en el fondo de la cámara y en la parte superior se preparó un gel al 4% (gel concentrador) con el mismo grosor. Los geles se colocaron en una cámara de electroforesis.^{VII}

Las proteínas obtenidas de ambas fases y residuos de estas se mezclaron con amortiguador de muestra en una relación 1:1 (Apéndice 2). Posteriormente, se mantuvieron en ebullición durante 5 min, las muestras se colocaron en los pozos 15 µl en cada uno. La electroforesis se realizó a 50V en la parte del gel concentrador y se aumento a 100V en el gel separador en un amortiguador (Apéndice 2) que nos permita transmitir la electricidad. Una vez que finalizó la electroforesis, el gel se tiñó con azul brillante de Coomassie (Apéndice 2) colocando en agitación^{XII} de 12 a 16 horas se retiró el colorante y se agregó una solución desteñidora (Apéndice 2), realizando varios cambios hasta que las bandas fueron visualizadas. Posteriormente se lavó el gel en varias ocasiones con agua destilada, para su conservación se fijó en papel celofán dulce para lograr una deshidratación apropiada.

3.2.2 Hidrólisis de la proteína

La hidrólisis se realizó para alcanzar una mayor concentración de proteína para su cuantificación; se colocaron en un tubo Eppendorf® 30 µl del extracto de membranas externas (ambas fases) y en otro tubo el residuo de la extracción para corroborar que no se pierda la proteína antes de desechar este residuo.

A cada muestra se le agregó 1 ml de ácido tricloroacético (grado biología molecular) y se coloca en hielo durante 30 minutos para lograr una precipitación. Al finalizar este periodo la muestra es centrifugada a 9,000 xg durante 15 minutos^X el sobrenadante es desechado y la pastilla fue resuspendida en 1 ml de NaOH a 0.4 N.^{98, 99}

^{VII} Bio-Rad, Mod. Mini-PROTEAN II Cell

3.2.3 Cuantificación de la proteína

Se realizó por medio de un sistema comercial para la cuantificación de proteínas BCA®^{VIII} El cual es un reactivo que evidencia por medio de una reacción colorimétrica la presencia de proteínas.

En una placa de 96 pozos ^{IX}se colocaron diferentes concentraciones de albumina sérica bovina (ABS) para obtener una curva patrón de albumina y poder realizar equivalencias con nuestras muestras. Se colocó también 1 µl de las muestras a evaluar de las proteínas de membrana externa (ambas fases) y se aforó a 100 µl del reactivo BCA (Ver Apéndice 1) y se mantuvo en incubación durante 2 horas a una temperatura de 37°C protegido de la luz, transcurrido este tiempo se realizó la lectura de la densidad óptica en lector de ELISA^X a 595nm de absorbancia y los valores obtenidos fueron graficados para encontrar la concentración de proteína de cada muestra. (Ver Apéndice 2).⁹⁹

3.3 PREPARACIÓN DE SUEROS TESTIGO

3.3.1 Preparación del antígeno para inoculación

3.3.1.1 Desnaturalización de proteínas

Las proteínas de la membrana externa fueron sometidas a un proceso de desnaturalización por medio del cual se pretende realizar una linearización de las proteínas tomando 1,200 µl de proteína equivalente a 5.5 mg/ml los cuales se colocaron en 2 tubos Eppendorf® con 600 µl en cada tubo y se le adicionaron 12 µl de 2-mercaptoethanol, 120 µl de SDS (sodium dodecyl sulfate)/ 468µl de inhibidor de proteasas, (Ver Apéndice 2) cada vial se homogenizó y se calentó a una temperatura de 96°C durante 5 minutos.^{98, 99}

3.3.1.2 Preparación del Inóculo de membranas externas

A esta preparación se le adicionaron 1,200; es decir un volumen igual al obtenido, de carbopol al 0.5% al momento de preparar las jeringas para la inoculación, el cual nos va a servir como adyuvante en la inoculación. Para obtener un volumen total de inoculación de 2.4 ml.⁹⁹

^{VIII} Micro BCA™ Protein Assay Kit.

^{IX} Maxi Sorp Surface, Nunc Immuno Plate

^X Bio Rad Mod 3550

3.3.1.3 Preparación del inóculo de leptospiras completas

Se colectaron 5 ml de cultivo en medio EMJH de *leptospiras* a 8×10^7 leptospiras/ml que son transferidos a un tubo Nalgene ® perfectamente sellados y fueron colocados en “baño maría”^{XI} para inactivar la cepa a una temperatura de 56°C durante 30 minutos. Posteriormente, se centrifugaron^{XII} a 15 000 xg durante 10 minutos a 4°C, la pastilla obtenida se resuspendió en 5 ml de SSF estéril (Ver Apéndice 1), el procedimiento de centrifugación se repitió y la pastilla obtenida se resuspendió en 2.5 ml de SSF estéril, esto se realizó para limpiar los desechos de medio que contiene albúmina, para evitar una reacción alérgica en los animales al inocular. Estos 2.5 ml fueron divididos en dos tubos Ependorff ® a cada uno se agregaron 1.1 ml de carbopol utilizado como adyuvante para mantener la relación 1:1.

3.3.2 Inmunización de animales

Se utilizaron 4 conejos raza Nueva Zelanda procedentes de un bioterio, con un peso de 2.5 a 3 kg, de estos animales se obtuvo una muestra de 3 ml de sangre sin anticoagulante para el monitoreo serológico previo a la inoculación.

Los conejos fueron inmunizados vía subcutánea en la región dorsal los días 0, 4, 7, 21 y 28 desinfectando perfectamente el área con alcohol antes de la inoculación.

Los 2 primeros conejos fueron inoculados con una cepa inactivada de *L. interrogans* serovariedad Hardjo (Hardjoprajitno); y los otros 2 conejos fueron inoculados con los extractos de membranas externas de la misma serovariedad para obtener sueros inmunes para utilizar como testigo positivo en la estandarización del ELISA.⁹⁹

3.3.3 Estandarización del ELISA

Para la calibración de la prueba de ELISA se utilizaron sueros testigos de conejos y bovinos, mientras que para la evaluación de la prueba de ELISA se utilizaron 100 sueros de bovinos provenientes de campo.¹⁰⁰

^{XI} Fisher Scientific 902N0228

^{XII} Rotor Beckman TJ6RS

3.3.3.1 Sueros Testigo

Se obtuvieron 3 ml de sangre de los conejos antes de la inoculación para realizar la prueba de AM y calibrar la concentración óptima del antígeno y el anticuerpo en la prueba de ELISA. Obteniendo sangre antes de cada inoculación para medir anticuerpos anti-*Leptospira*. Al finalizar el esquema de inoculación, se realizó el sangrado en blanco de los conejos.

La sangre colectada de los conejos fue obtenida de la vena marginal utilizando jeringas de 3 ml con aguja de 22G sin adicionar anticoagulantes para la formación del coágulo se obtuvo mediante centrifugación^{XIII} a 7,000 xg durante 5 minutos. El sangrado en blanco de los conejos se realizó previa anestesia disociativa con Ketamina a 40 mg/kg por vía intramuscular, una vez sedados la colección de la sangre fue por vía intracardiaca, utilizando agujas de un calibre de 18G con jeringas de 20 ml. Una vez colectada la sangre fue colocadas en cajas de Petrí estériles para la formación del coagulo, que fue cortado con una navaja de bisturí para liberar la mayor cantidad de suero. Una vez separado, el suero fue filtrado por medio de una gasa y posteriormente se centrifugó^{XIX} a 7,000 xg durante 10 minutos para quitar algún residuo de glóbulos rojos en el suero, y fueron distribuidos en tubos Ependorff ® y se congelaron^{XIV} hasta su uso.^{81, 99}

3.3.3.2 Sueros de Bovino para evaluación del ensayo

Para la evaluación de la prueba de ELISA y comparación con AM, se utilizaron 100 sueros de bovinos. Estos sueros fueron proporcionados por el departamento de Microbiología e Inmunología provenientes de una muestra de 262 individuos de 19 hatos de bovinos (*Bos indicus*) de cría en pastoreo del estado de Tabasco (Trópico húmedo Mexicano). Provenientes de hatos no inmunizados, asumiendo que el título de anticuerpos mostrado por estos bovinos provenía de una exposición natural al antígeno.¹⁰⁰

^{XIII} Rotor Beckman TJ6RS

^{XIV} Frigidare

Cuadro 3.1 Relación de sueros testigo utilizados

Tipo de Suero	AM	Utilidad
Inmunes de conejo contra <i>Leptospiras</i> completas	1:0	Control negativo. 1ª Fase de estandarización.
Inmunes de conejo contra <i>Leptospiras</i> completas	1:100	Control positivo. 1ª Fase de estandarización.
Inmunes de conejo contra Extractos de membrana	1:0	Control negativo. 1ª Fase de estandarización.
Inmunes de conejo contra Extractos de membrana	1:400	Control positivo. 1ª Fase de estandarización.
Suero de bovino (sistema comercial) ^{XV}	1:0	Control negativo. Estandarización en bovinos y punto de corte
Suero de bovino de campo, no vacunado	1:100	Control positivo título bajo Estandarización en Bovinos y Punto de Corte
Suero de bovino de campo, no vacunado	1:25000	Control positivo título alto. Estandarización en bovinos y punto de corte
100 Sueros de bovinos de campo, no vacunados	Varios	Validación y comparación entre AM y ELISA.

3.4 Aglutinación Microscópica

Para realizar la prueba serológica de AM, se utilizó como antígeno un cultivo de *Leptospira* Hardjoprajitno en medio EMJH con un desarrollo aproximado de 2×10^8 leptospiras/ml.⁸¹

Se utilizó una dilución inicial de los sueros de 1:25 en SAF (Ver Apéndice 1) y a partir de estas se realizaron las diluciones dobles desde 1:50, hasta 1:3,200, en la mayor parte de los sueros. Aquellos que presentaron títulos superiores a 1:3,200, fueron diluidos hasta encontrar la dilución más alta con reacción positiva. Todas las reacciones se desarrollaron en un volumen de 50 µl en placas de 96 pozos,^{XV} a las cuales se les adicionó una gota de antígeno. (50µl aproximado) (*L. interrogans* serovariedad Hardjoprajitno) se incubó durante 1 hora a 37 °C,^{VIII} se realizó la lectura observando la placa en un microscopio de campo oscuro^{XVI} observando el grado de aglutinación y encontrando el punto de dilución en el cual la aglutinación ya no es evidente. Considerando como positivos sueros con títulos de por lo menos 1:100 para la serovariedad (Hardjoprajitno).⁸¹

^{XV} Kit para determinación de IBR mediante ELISA indirecta IDEX ®.

^{XVI} Microscopio de Campo Oscuro Leika ®

3.5 Estandarización de ELISA

La estandarización de la ELISA se realizó mediante la realización de diversos ensayos en donde se probaron diferentes diluciones de los 3 diferentes tipos de antígeno (cultivos totales inactivados de *L. interrogans* serovariedad Hardjo y membranas externas extraídas por el método modificado de Matsunaga nativas y sometidas a un proceso de desnaturalización). Y diluciones de sueros testigo positivo y negativo de conejo para la estandarización de los parámetros idóneos de la prueba y de bovino para probar, validar y comparar el ensayo frente a la AM. Para esto, se utilizaron inmunoplaquetas^{XV} de 96 pozos con fondo plano.

El conjugado utilizado fue: para los ensayos con sueros de conejo, suero de cabra con anticuerpos contra IgG de conejo (sigma ®) y para el caso de los sueros de bovinos se utilizó un suero de cabra con anticuerpos contra IgG de bovino (sigma ®).^{99, 101, 102}

3.5.1 Antígenos de Captura

3.5.1.1 Antígeno de captura de leptospiras totales.

Se utilizaron 100 ml de cultivo en medio EMJH de la serovariedad Hardjoprajitno a una concentración aproximada de 8×10^7 mismos que fueron transferidos a tubos Nalgene ® sellados y colocados en “baño María”^{XVII} para inactivar a una temperatura de 56°C durante 30 minutos, posteriormente se centrifuga el cultivo a $13,000 \times g$ ^{XIX} durante 15 minutos a 4°C, el sedimento obtenido se resuspendió, en 10 ml de SSF estéril (Ver Apéndice 1), se retiró el sobrenadante y se repitió este paso una vez.

3.5.1.2 Antígeno de captura de membranas externas desnaturalizadas

Se colocaron 1,200 µl de proteínas totales de membrana externa en un tubo Ependorff® más 24 µl de mercapto-ethanol, 240 µl de SDS y 936 µl de inhibidor de proteasas (Ver Apéndice 1). Esta preparación fue homogenizada utilizando un agitador tipo vortex^{XI} y se colocó a 96°C en baño María^{XVII} durante 5 minutos. La finalidad de este procedimiento es linearizar a las proteínas para un mejor reconocimiento antigénico.^{98, 99, 101}

3.5.1.3 Antígeno de captura de membranas externas nativas

El antígeno de captura de membranas externas nativas no fue sometido a ninguna proceso antes de su colocación en las placas.^{XV}

3.5.2 Unión del antígeno a la fase sólida.

Para la fijación del antígeno, se utilizaron placas^{XV} de 96 pozos con fondo plano, en las placas se colocaron diferentes concentraciones de antígeno para la fijación del mismo. (Ver cuadros 3.2 - 3.8) cbp. 100 µl de SAF (Ver Apéndice 1) y se deja incubar durante 24 horas a temperatura ambiente. Cumplido este tiempo, se realizarán lavados con SAF-Tween (Ver apéndice 1) y se realizó el bloqueo de la placa colocando 100 µl de albúmina sérica bovina^{XVII} al 1% en cada pozo e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron lavados con SSAF con tween 20. (Ver apéndice 1)^{98, 101, 102}

3.5.2.1 Unión Antígeno-Anticuerpo

Después se enfrentaron los sueros al antígeno colocando 100 µl de la dilución correspondiente de los sueros (cuadros 3.2- 3.8) y se coloca en la incubadora^{VIII} 1 hora a 37°C.

Finalizado el tiempo se realizó el lavado con SAF + tween (ver Apéndice 1) y se coloca el conjugado 100µl^{XVIII} durante 1 hora a 37°C; mientras se lleva a cabo la incubación, se preparó la solución de cromógeno (Ver Apéndice 1). Se realizó el correspondiente lavado con SAF-Tween y se colocó el cromógeno-substrato^{XIX} al terminar el proceso de incubación (100 µl), la placa es protegida de la luz y se realiza la lectura colorimétrica por medio de un lector de ELISA^{XVI} con filtro de 405 nm a los 15, 25 y 35 minutos.^{98, 101, 102}

Las condiciones de concentración de antígeno, dilución de sueros, número de lavados y repeticiones variaron en cada ensayo como se indica en los puntos 3.5.3 al 3.5.9

^{XVII} Equine

^{XVIII} Conjugado suero de cabra anti IgG de conejo o bovino, Sigma®

^{XIX} TMB sigma®

3.5.3 Primer ensayo de estandarización de ELISA con suero de conejo.

Se probaron los tres tipos de antígeno de captura, membranas nativas, membranas desnaturalizadas y leptospiras totales; el antígeno se colocó a diferentes concentraciones, los sueros positivos y negativos con diluciones triples seriadas, realizando 3 lecturas. (Cuadro 3.2)

Cuadro 3.2 Condiciones establecidas para el primer ensayo

VARIABLES						
Concentración de Antígeno	Membranas Nativas	1 µg	2 µg	3 µg	4 µg	5 µg
	Membranas Desnaturalizadas	1 µg	2 µg	3 µg	4 µg	5 µg
	Leptospiras Totales células/pozo	2x10 ⁶	4x10 ⁶	6x10 ⁶	8x10 ⁶	1x 10 ⁷
<ul style="list-style-type: none"> • Diluciones de los sueros desde 1/50 hasta 1/4050 • Tiempo de lectura: 15 min, 25 min, 35min • Lectura a 405 nm • 1 Réplica 						

3.5.4 Segundo Ensayo

Se probaron sólo 2 tipos de antígeno; el antígeno se colocó a diferentes concentraciones y los sueros positivos y negativos con diluciones triples seriadas, realizando 3 lecturas a 405 nm con 3 réplicas. (Cuadro 3.3)

Cuadro 3.3 Condiciones establecidas para el segundo ensayo

VARIABLES				
Concentración de Antígeno	Membranas Nativas	1 µg	2 µg	3 µg
	Membranas Desnaturalizadas	1 µg	2 µg	3 µg
	Leptospiras Totales células/pozo	2x10 ⁶	4x10 ⁶	6x10 ⁶
<ul style="list-style-type: none"> • Diluciones de los sueros desde 1/50 hasta 1/109,350 • 3 Réplicas • Tiempo de lectura: 15 min, 25 min, 35min • Lectura a 405 nm 				

3.5.5 Tercer Ensayo

Se realizó sólo con un tipo de antígeno (leptospiras totales); el antígeno se colocó a 2 concentraciones; los sueros positivos y negativos fueron filtrados con una membrana de .22; con diluciones triples seriadas realizando un aumento de 3 a 5 lavados y 3 lecturas a 405 nm con 3 réplicas. (Cuadro 3.4)

Cuadro 3.4 Condiciones establecidas para el tercer ensayo

VARIABLES			
Concentración de Antígeno	Leptospiras Totales células/pozo	2x10 ⁶	4x10 ⁶
<ul style="list-style-type: none">• Aumento de lavados de 3 a 5• Diluciones de los sueros desde 1/50 hasta 1/109,350• 3 Réplicas• Tiempo de lectura: 15 min, 25 min, 35min• Lectura a 405 nm			

3.5.6 Cuarto Ensayo

Se utilizaron leptospiras totales como antígeno de captura; a 2x10⁶ leptospiras/ ml, suero positivo y negativo de bovino con diluciones triples seriadas hasta 1/4,050 con 3 lecturas a 405 nm con 3 réplicas. (Cuadro 3.5)

Cuadro 3.5 Condiciones establecidas para el cuarto ensayo

VARIABLES			
Concentración de Antígeno	Leptospiras Totales células/pozo	2x10 ⁶	4x10 ⁶
<ul style="list-style-type: none">• Aumento de lavados de 3 a 5• Diluciones de los sueros desde 1/50 hasta 1/4050• 3 Réplicas• Tiempo de lectura: 15 min, 25 min, 35min• Lectura a 405 nm			

3.5.7 Ensayo piloto para punto de corte

Se utilizaron leptospiras totales como antígeno de captura; este se colocó a una concentración de 2×10^6 leptospiras/ ml, sueros positivos y negativos de bovino y de conejo con una dilución de 1/100 con 3 lecturas a 405 nm con 6 réplicas. (Ver cuadro 3.6)

Cuadro 3.6 Condiciones establecidas para el ensayo piloto de punto de corte.

VARIABLES		
Concentración de Antígeno	Leptospiras Totales células/pozo	2×10^6
<ul style="list-style-type: none">• 5 Lavados• Dilución de los sueros 1/100• 6 Réplicas• Tiempo de lectura: 15 min, 25 min, 35min• Lectura a 405 nm		

3.5.8 Ensayo Punto de corte

Se utilizaron leptospiras totales como antígeno de captura; este se colocó a una concentración de 2×10^6 leptospiras/ ml con un suero positivo con un título de 1:100, uno de 1:25,000 por AM y un suero negativo de bovino con una dilución de 1/100 con 3 lecturas a 405 nm con 40 réplicas para el título de 1:100 y 36 réplicas de 1:25,000 y suero negativo. (Cuadro 3.7)

Cuadro 3.7 Condiciones establecidas para el punto de corte con sueros control de bovino.

VARIABLES			
Concentración de Antígeno	Leptospiras Totales células/pozo	2×10^6	
Sueros control de Bovino	Positivo título 1:100	Positivo título 1:25,000	Negativo -
<ul style="list-style-type: none">• 5 Lavados• Dilución de los sueros 1/100• 36 Réplicas sueros positivos y 40 sueros negativos• Tiempo de lectura: 15 min, 25 min, 35min• Lectura a 405 nm			

3.5.9 Ensayo sueros de campo

Se utilizaron leptospiras totales como antígeno de captura; este se colocó a una concentración de 2×10^6 leptospiras/ ml con un suero positivo con un título de 1:25,000 por AM y un suero negativo de bovino y 100 sueros de campo con una dilución de 1/100 con 3 lecturas a 405 nm con 3 réplicas.

(Cuadro 3.8)

Cuadro 3.8 Condiciones utilizadas para el estudio de frecuencia relativa por prueba de ELISA con sueros de bovino (sueros de campo).

VARIABLES		
Concentración de Antígeno	Leptospiras Totales células/pozo	2×10^6
Sueros control de bovino	Positivo título	Negativo
	1:25000	-
100 sueros de bovino de campo		
	<ul style="list-style-type: none">• 5 Lavados• Dilución de los sueros 1/100• 3 Réplicas• Tiempo de lectura: 15 min, 25 min, 35min• Lectura a 405 nm	

3.6 Análisis estadístico

El análisis de resultados descriptivo se presenta como gráficos de medias aritméticas con desviación estándar o error estándar y porcentajes (frecuencia relativa) con intervalo de confianza al 95% de las diversas variables de interés en el estudio como se describe en el **Cuadro 3.9**. Los análisis estadísticos y elaboración de gráficos se realizaron con el apoyo de los Programas EXCEL (Microsoft Office®) y NCSS 2000 - PASS 2001.^{XX}

^{XX} Hintze JL, Quick Start & Self Help Manual, NCSS Statistical System, Published by NCSS, Kaysville, Utah <http://itchy.icw.com/ncss/NCSS%20QuickStart.pdf>

Cuadro 3.9.- Descripción de pruebas estadística descriptivas o analíticas empleadas durante la investigación. ^{79, 103, 104}

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	
Tipo de estadístico descriptivo o analítico	Objetivo de su uso
Media aritmética de las réplicas.	Identificar mediante estadística descriptiva: condiciones de antígeno, diluciones del suero y manejo del ensayo.
Media aritméticas y desviación estándar.	Establecer punto corte en el ELISA.
Medias aritméticas y desviación estándar, error estándar y coeficiente de variación.	Evaluar la repetibilidad y variabilidad del ensayo con sueros de conejo y bovino.
Media y error estándar de la densidad óptica,	Frecuencia relativa y coeficiente de variación al 95% y χ^2 para evaluar diferencias entre frecuencias (Valor $-p$ (<0.05) para aceptar diferencias estadísticamente significativa). Evaluación de repetibilidad de ELISA para <i>Leptospira</i> con sueros de bovino de población abierta.
Exactitud (%) Acuerdo observado entre pruebas (%) Acuerdo esperado más allá del azar (%) Coeficiente Kappa χ^2 de McNemar Sensibilidad (%) Especificidad (%) Valor predictivo positivo (%) Valor predictivo negativo (%) Proporción de falsos positivos (%) Proporción de falsos negativos (%)	Evaluación comparativa del ensayo de ELISA propuesto, con la prueba estándar AM, en cada uno de los tiempos de lectura.

Para el análisis comparativo de los resultados obtenidos entre AM y ELISA de los 100 sueros de bovino de campo, interpretados como positivos o negativos, se utilizó el siguiente cuadro de equivalencias (**Cuadro 3.10**), para clasificar los resultados y la aplicar las formulas necesarias (**Cuadro 3.11**) para el análisis correspondiente.

3.10 Cuadro de equivalencias para la utilización de formulas ^{103,104}

Cuadro de equivalencias de resultados para su estudio			
AM \ ELISA	Sueros Positivos	Sueros Negativos	Total
Sueros Positivos	a	b	a+b
Sueros Negativos	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d

3.11 Cuadro de Formulas utilizadas para los análisis estadísticos. ^{103,104}

Parámetros	Formulas
Acuerdo observado entre pruebas	$(a+d)/(a+b+c+d)$
Acuerdo esperado por probabilidad	$((a+b)*(a+c)/(a+b+c+d)+(c+d)/(b+d)/(a+b+c+d)/(a+b+c+d))$
Acuerdo real mas allá de la probabilidad	(Acuerdo observado entre pruebas) -(Acuerdo esperado por probabilidad)
Potencial de acuerdo más allá de la probabilidad	(1- Acuerdo esperado por probabilidad)
Kappa	$((2*(a*d)-(b*d))/((a+b)*(c+d)+(b+d)*(a+c)))$
X2 de McNemar	$(b-c)*(b-c)/(b+c)$
Valor -p	<0.01
exactitud	$(a+d)/(a+b+c+d)$
Sensibilidad	$a / (a+b)$
Especificidad	$d / (c+d)$
Valor Predictivo Positivo (PPV)	$a/ (a+c)$
Valor Predictivo Negativo (NPV)	$d / (b+d)$
Falsos Positivos	$c / (a+c)$
Falsos Negativos	$b / (b+d)$
Prevalencia de AM	$(a+b) / (a+b+c+d)$

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

"Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano". Isaac Newton.

4.1 Preparación de antígenos (Cultivo bacteriano)

Se obtuvieron 650 ml de cultivo de una cepa de *Leptospira interrogans* Hardjoprajitno, de 7 días de desarrollo, con una cuenta aproximada de 2×10^8 células/ml. Del volumen total se utilizaron 100 ml para producción de sueros hiperinmunes en conejo; 100 ml para AM (sueros de conejo y bovino); 300 ml para diferentes etapas de estandarización de antígenos en el ensayo de ELISA (leptospiras totales y extracto de membranas externas) y 100 ml para la ELISA estandarizada leptospiras totales (fase acuosa y fase detergente) con 100 sueros de bovinos en tres réplicas.

4.2 Preparación de antígenos (Extracción de la membrana externa)

Se obtuvo una suspensión de extractos de membrana externas, con una concentración de 1 μ g de proteínas totales (fase acuosa y fase detergente) en 5.5 μ l de suspensión con un volumen total de 7 ml.

4.2.1 Visualización de proteínas

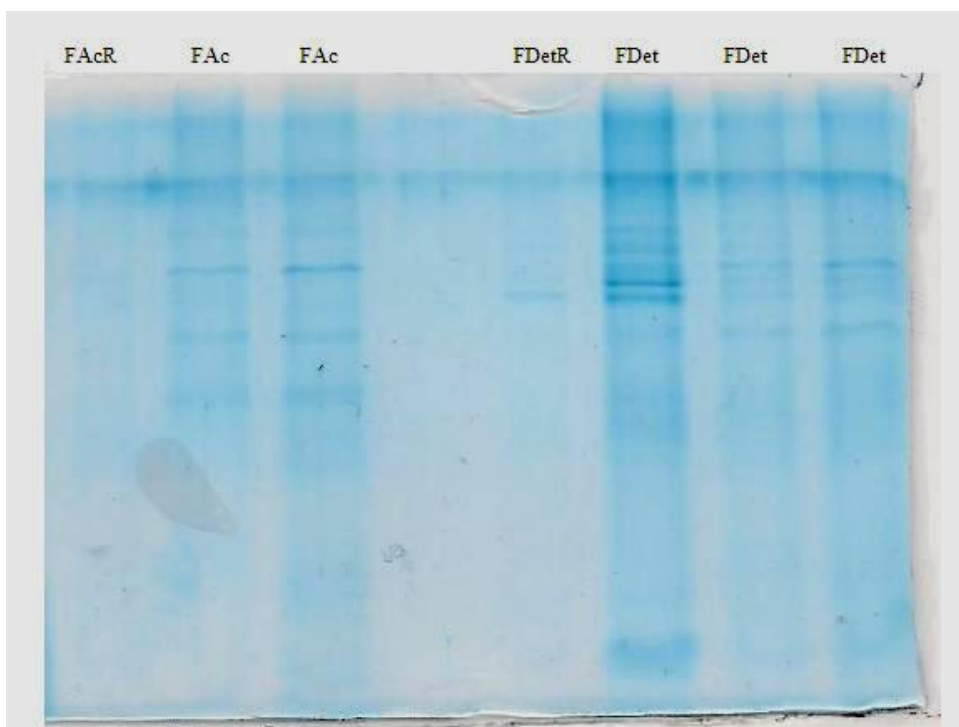


Figura 4.1. Gel de poliacrilamida en donde se evidencia la presencia de proteínas en las diferentes fases en donde: **FAcR** y **FDetR** es el residuo de la extracción para corroborar que no hay proteínas en el residuo, **FAc** es la fase acuosa de la extracción, **FDet** Fase detergente de la extracción.

4.3 Muestras de suero para monitoreo de conejos en producción de sueros testigo.

Se obtuvo una muestra inicial (día 0) de suero a partir de 3 ml de sangre sin anticoagulante de los conejos para iniciar el monitoreo serológico. Posteriormente, el día 28 al finalizar el esquema de inoculación se realizó el sangrado total de cada animal obteniendo aproximadamente 50 ml de suero de cada uno. Todos los sueros se sometieron a la prueba de AM, los resultados se presentan en el **Cuadro 4.1**.

Cuadro 4.1.- Títulos de aglutinación microscópica en sueros testigo de conejos con dos antígenos diferentes (leptospiras totales y extractos de membrana de leptospiras), los días 0 y 28 del esquema de inoculación. SD= sin dato.

Tipo de antígeno	Animal	Título de aglutinación microscópica	
		Día 0	Día 28
Leptospiras Totales	A	1:0 negativo	1:200
	B	1:0 negativo	1:400
Extracto de membranas	C	1:0 negativo	1:100
	D	1:0 negativo	1:100
Testigo Negativo	E	Sin Datos	1:0 negativo

4.4 Resultados de ELISA con los diferentes antígenos de captura.

4.4.1 Primer ensayo

Los resultados para la evaluación de los diferentes tipos de antígeno de captura, concentración del mismo y diferentes rangos de dilución de sueros de conejo, testigo positivo y negativo se presentan como figuras, donde cada icono en la gráfica representa la media aritmética de la densidad óptica (405 nm) con tres réplicas en cada dilución y de tres lecturas (15, 25 y 35 minutos), (Figuras 4.2, 4.3 y 4.4). Las variables en el eje horizontal de cada gráfico fueron concentración de antígeno en microgramos para los extractos de membrana y en microlitros para leptospiras totales. Los datos originales se presentan en el Apéndice 2, Cuadros A.1-A.9

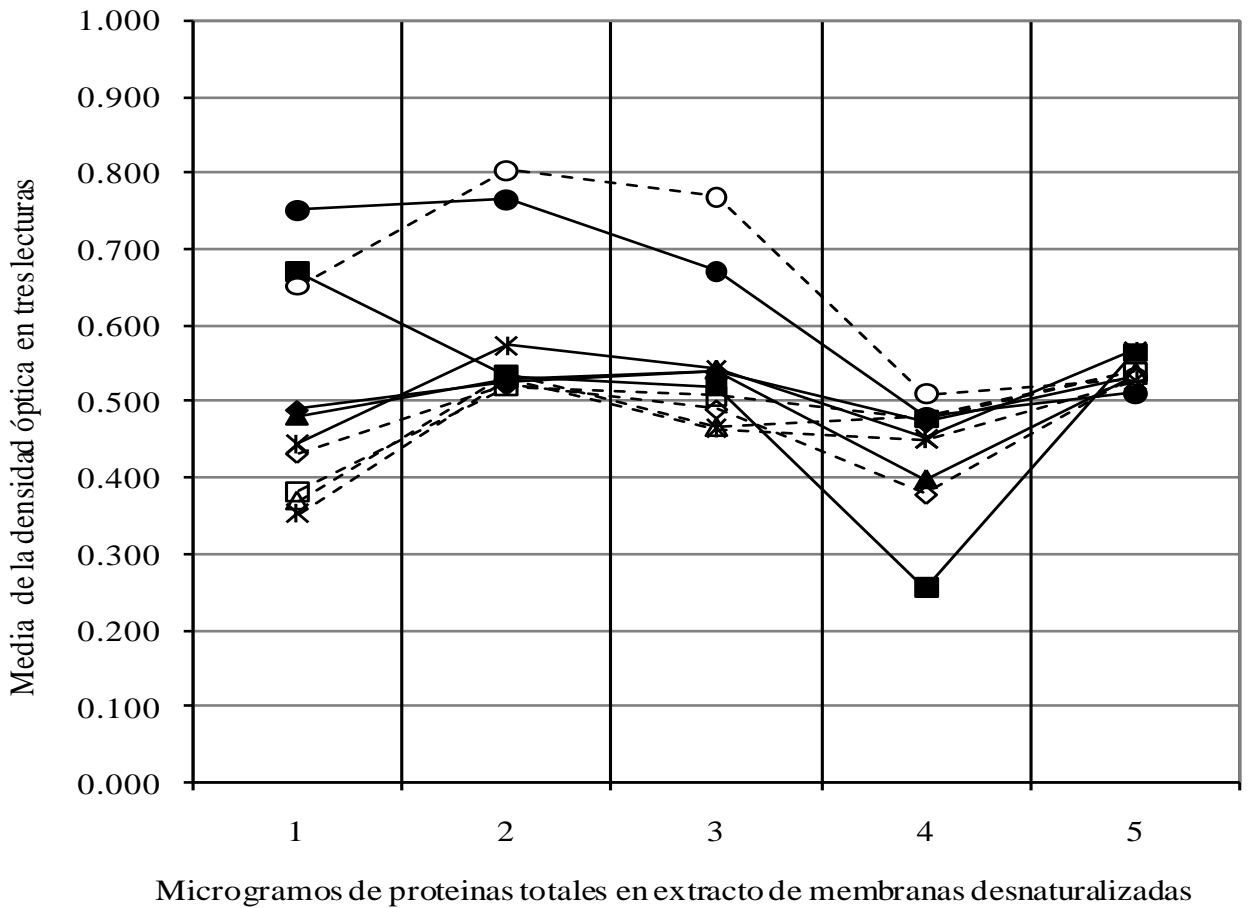


Figura 4.2.-Resultados del primer ensayo con membranas desnaturalizadas. Mostrados como la medias de las densidades ópticas a 405 nm, de tres réplicas en cada dilución, para los sueros hiperinmunes producidos en conejo con extractos de membrana con tres lecturas (15, 25 y 35 minutos), utilizando diferentes concentraciones de proteínas totales de los extractos de membranas desnaturalizadas, en cinco diluciones comparando suero testigo positivo y negativo de conejo.

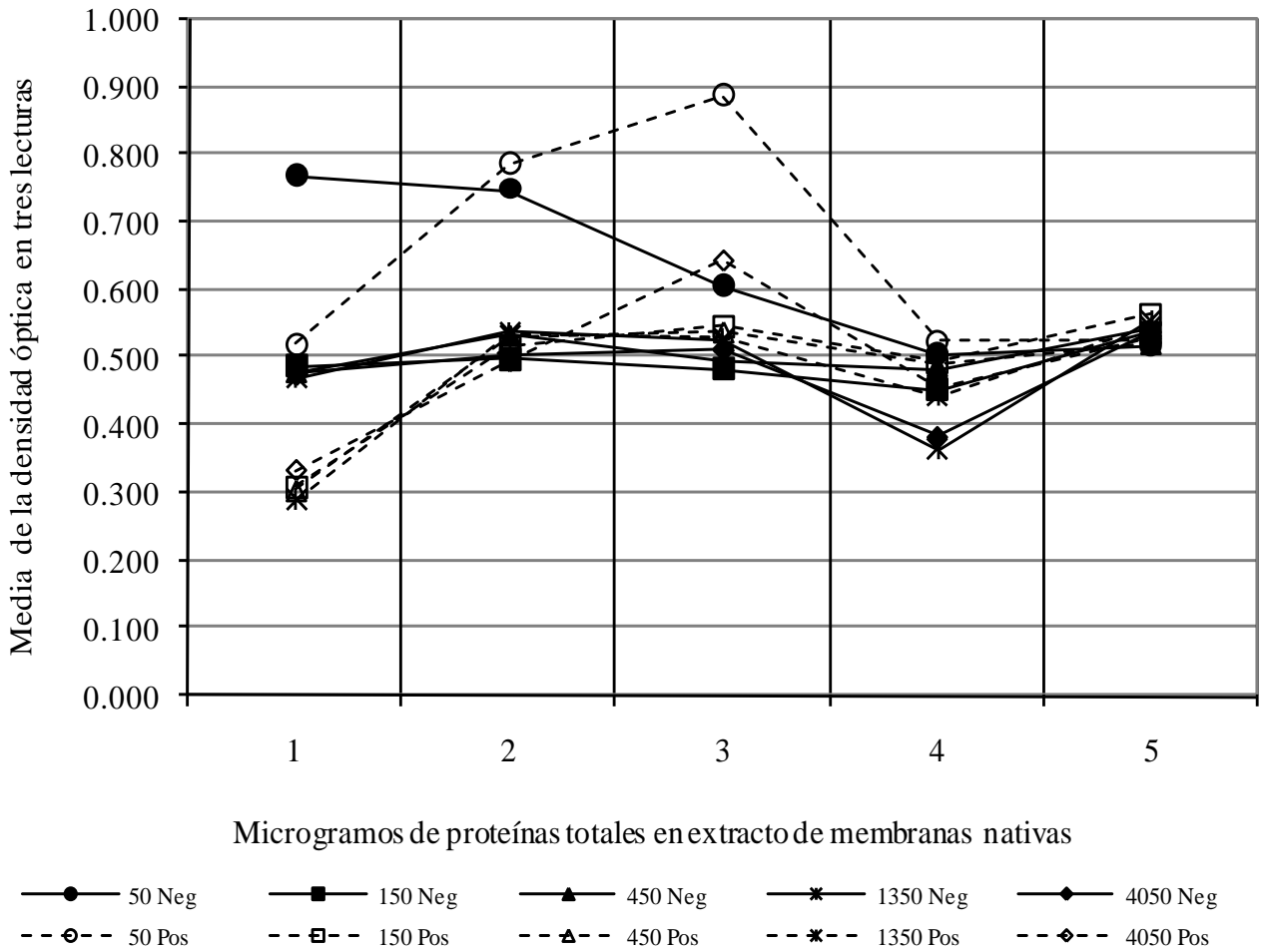


Figura 4.3.-Resultados del primer ensayo con membranas nativas. Mostrado como la media de la densidad óptica a 405 nm, de tres réplicas en cada dilución, para los sueros hiperinmunes producidos en conejo con extractos de membrana con tres lecturas (15, 25 y 35 minutos), utilizando diferentes concentraciones de proteínas totales de los extractos de membranas nativas, en cinco diluciones comparando suero testigo positivo y negativo de conejo.

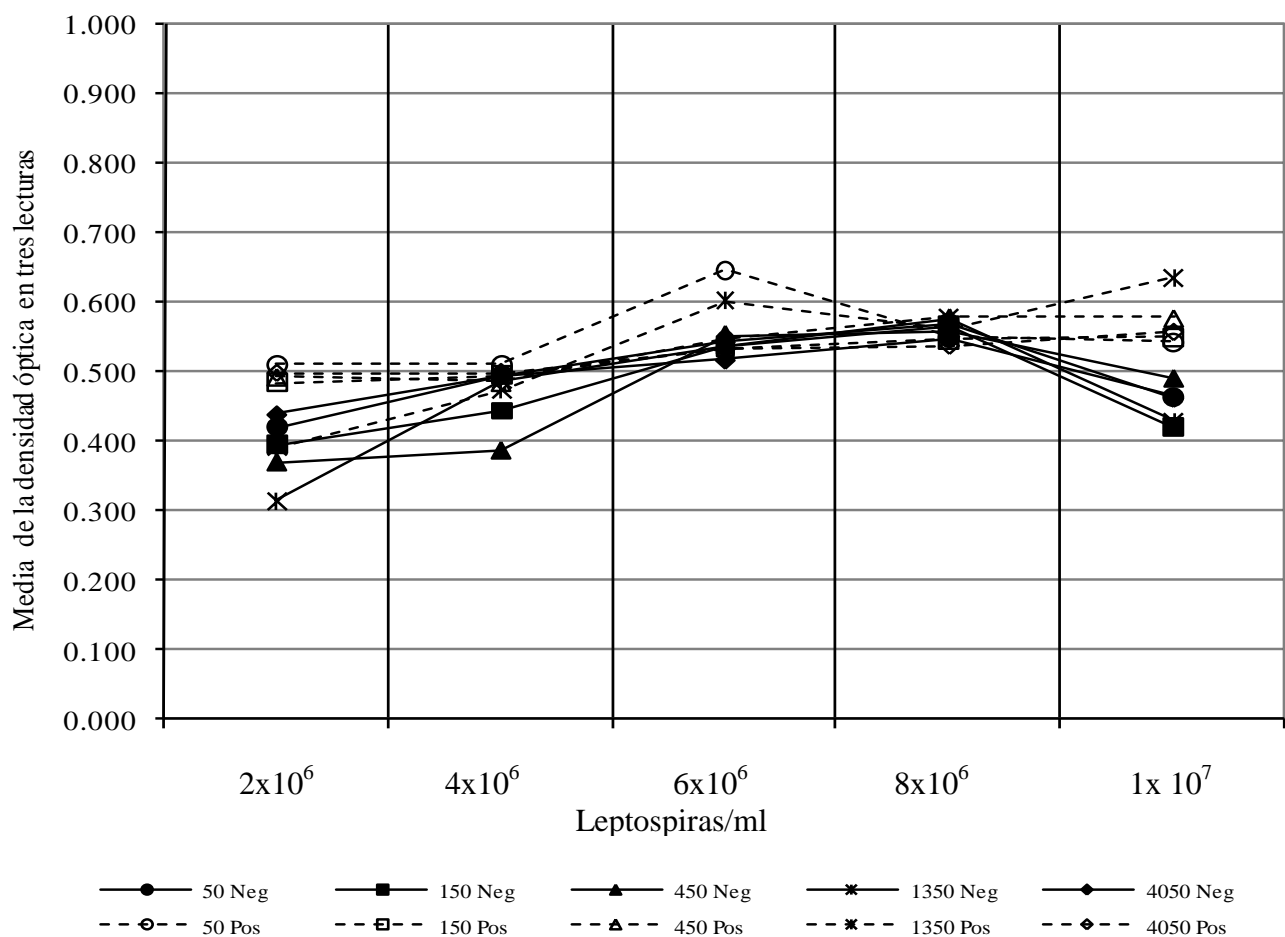


Figura 4.4.-Resultados del primer ensayo con *Leptospiras* totales Mostrado como la media de la densidad óptica a 405 nm, de tres réplicas en cada dilución, para los sueros hiperinmunes producidos en conejo con extractos de membrana con tres lecturas (15, 25 y 35 minutos), utilizando diferentes concentraciones de leptospiras totales, en cinco diluciones comparando suero testigo positivo y negativo de conejo.

4.4.2 Segundo ensayo

Se continuó el proceso de estandarización con dos tipos de antígenos de captura a) leptospiras totales inactivadas, y b) extractos de membrana nativas. Se descartó el uso de de membranas desnaturalizadas.

Los resultados para la evaluación de los diferentes tipos de antígeno de captura, concentración del mismo y diferentes rangos de dilución de sueros hiperinmunes control positivo y negativo se presentan como figuras, donde cada icono representa la media aritmética de la densidad óptica (405nm) en tres réplicas en cada dilución, en tres lecturas (15, 25 y 35 minutos) para membranas nativas en cada punto graficado (Figura 4.5) y en dos lecturas (15 y 25 minutos) para leptospiras totales (Figura 4.6).

Las variables en el eje horizontal de cada gráfico fueron concentración de antígeno en microgramos para los extractos de membrana y microlitros para leptospiras totales. Los datos originales se presentan en Apéndice 2, Cuadro A.10-A.22.

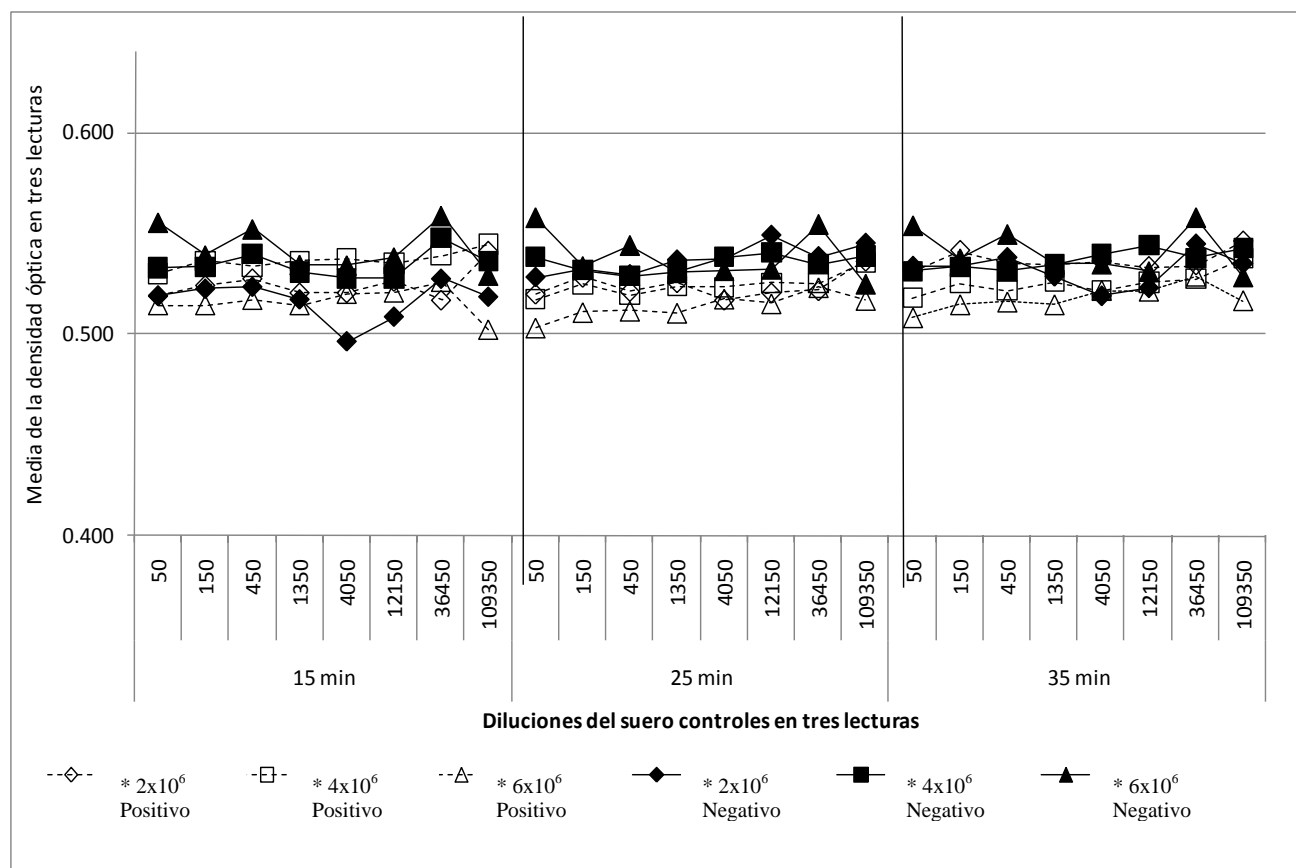


Figura 4.5.-Resultados del segundo ensayo con membranas nativas. Mostrado como la media de la densidad óptica a 405 nm, de tres réplicas en cada dilución, con tres lecturas (15, 25 y 35 minutos) de diferentes concentraciones de proteínas totales en extractos de membrana nativas, para los sueros hiperinmunes producidos en conejo con leptospiras inactivadas en 8 diluciones seriadas triples comparando suero control positivo producido con extracto de membrana y negativo. * Leptospiras/ml.

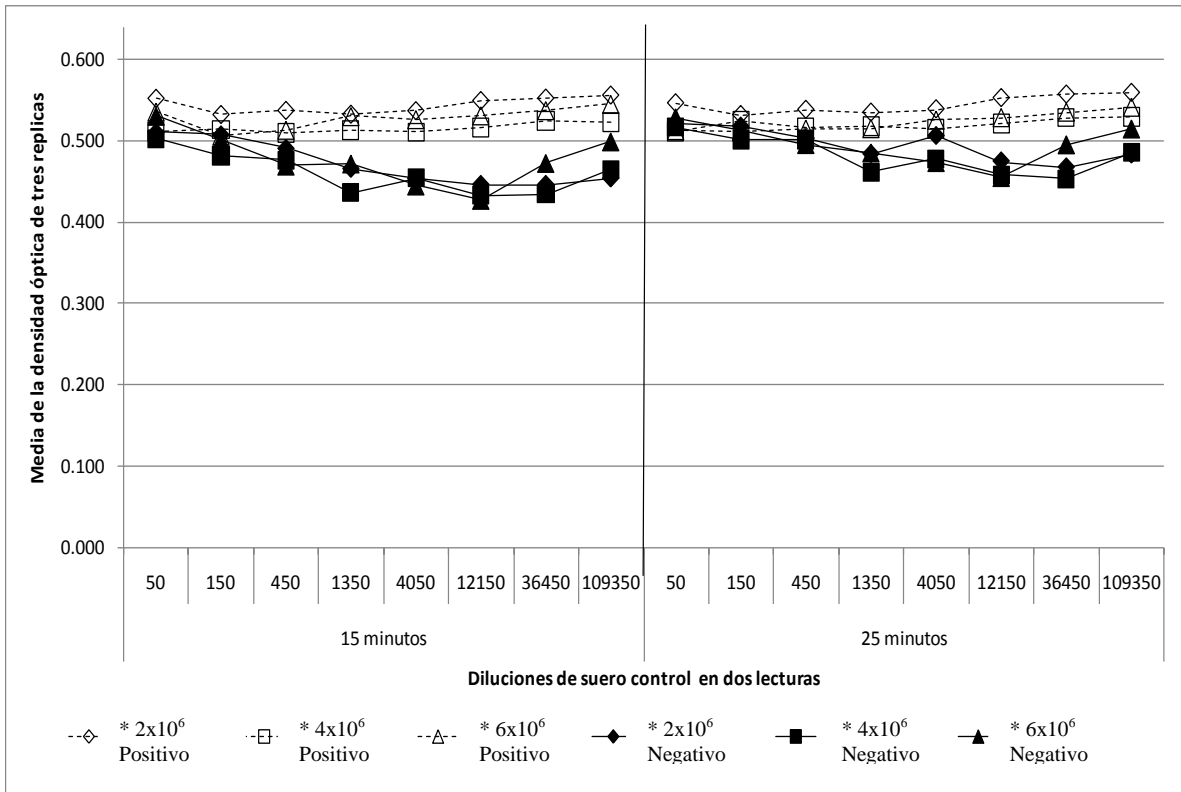


Figura 4.6.-Resultados del segundo ensayo con *Leptospiras* totales. Mostrado como la media de la densidad óptica a 405 nm, de tres réplicas en cada dilución, con dos lecturas (15 y 25 minutos) de diferentes concentraciones leptospiras totales, para los sueros hiperinmunes producidos en conejo con cultivo de inactivado en 8 diluciones seriadas triples comparando suero control positivo y negativo.

4.4.3 Tercer ensayo

En el presente ensayo se utilizaron leptospiras totales como antígenos de captura, se observó que la respuesta de densidad óptica de los sueros testigo positivo y negativo se agrupan en dos bloques diferentes no importando el volumen de antígeno utilizado.

Los resultados se presentan como media de la densidad óptica (405nm) en tres réplicas en cada dilución, con tres lecturas (15, 25 y 35 minutos) para leptospiras totales en cada punto graficado (Figura 4.7) donde la variable en el eje de las X es diferentes diluciones de los sueros control positivo y negativo en cada tiempo de lectura y en Y la densidad óptica para las diferentes concentraciones de antígeno de captura (2×10^6 o 4×10^6 Leptospiras/ml) Los datos originales se presentan en Apéndice 2, Cuadro A.23-A.27

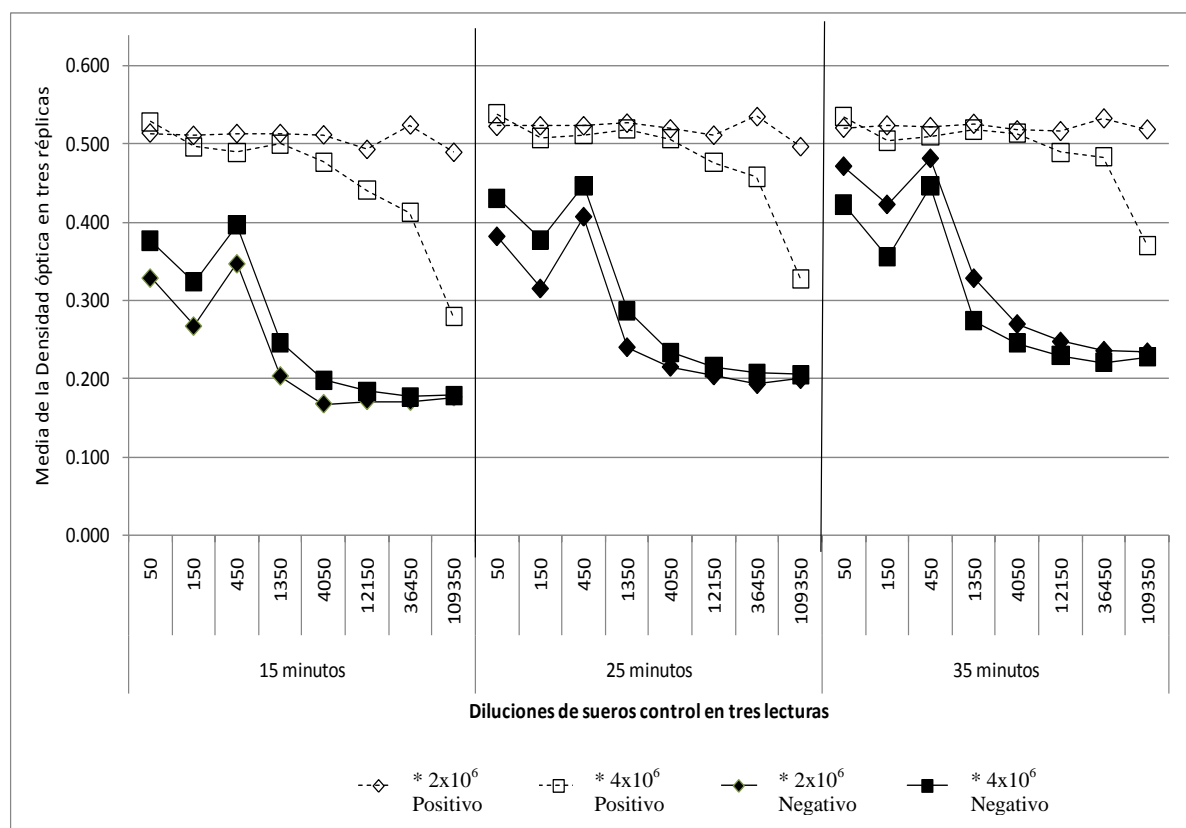


Figura 4.7.-Resultados del tercer ensayo con *Leptospiras* totales. Mostrado como la media de la densidad óptica a 405nm, de tres réplicas en cada dilución , en tres lecturas (15, 25, 35 minutos) utilizando dos volúmenes de leptospiras totales, con sueros hiperinmunes de conejo en 8 diluciones seriadas triples comparando suero control positivo y negativo con aumento a 5 lavados entre cada paso del prueba de ELISA.

4.4.4.- Cuarto ensayo

Con base en los parámetros obtenidos para el ensayo de ELISA con sueros de conejo se procedió a corroborar su funcionalidad con dos sueros control de bovino utilizando como antígeno de captura 2×10^6 o 4×10^6 Leptospiras/ml en cultivo inactivado de *L. interrogans* serovariedad Hardjoprajitno, siendo la única diferencia que el rango de dilución de los sueros, 5 diluciones triples seriadas (1:50 a 1: 4,050). Se designaron como sueros control de bovino, negativo sin títulos en AM y positivo con un título de 1:25,000 en AM. El ensayo de ELISA se realizó con las mismas condiciones establecidas para el ensayo 3. Los resultados se presentan en la Figura 4.8, donde las variables en el eje horizontal fueron las diferentes diluciones de los sueros control positivo y negativo. Los datos originales se presentan en Apéndice 2, Cuadro A.28.

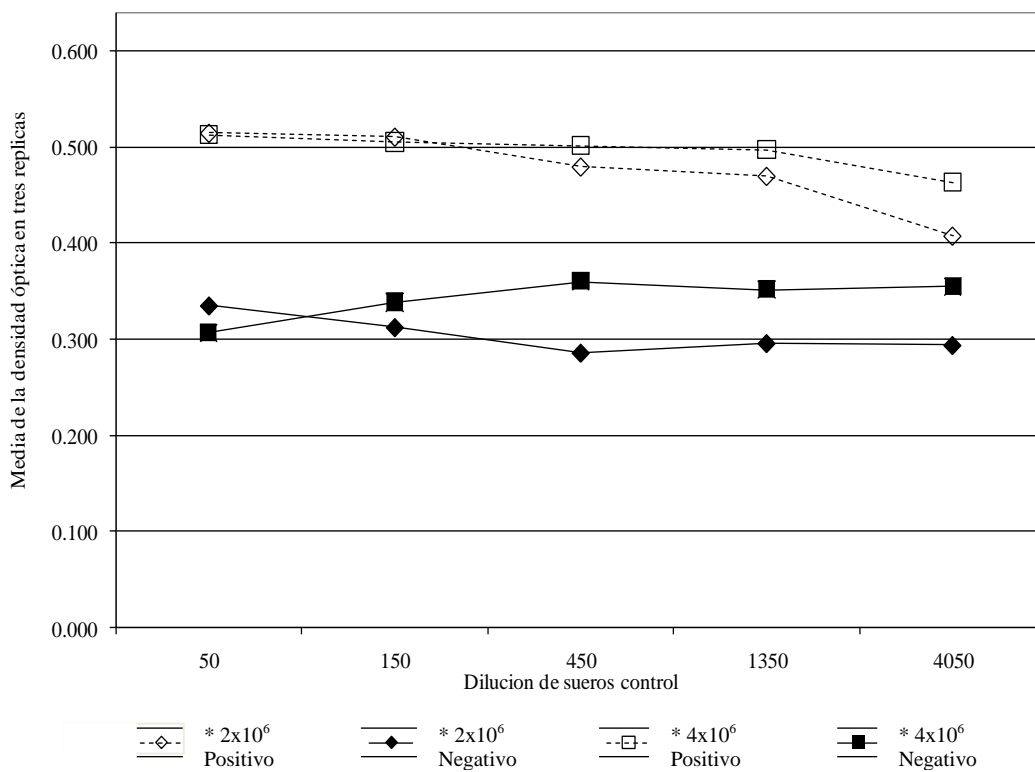


Figura 4.8.-Resultado del tercer ensayo con Leptospiras totales con suero de bovinos. Mostrado como la media de la densidad óptica a 405 nm, de tres réplicas en cada dilución, con una lectura (25 minutos) de dos volúmenes de leptospiras totales, para los sueros de bovino control positivo y negativo en 5 diluciones triples seriadas.

4.5 Identificación de condiciones óptimas para el ensayo de ELISA (ensayo piloto).

1.- Con base en los resultados del ensayo 4, se identificaron las condiciones óptimas para la estandarización de la metodología para el ensayo. Donde se decidió utilizar como antígeno de captura un volumen de 2×10^6 Leptospiras/ml de cultivo de leptospiras, una dilución de sueros de 1/100, con tres lecturas a 15, 25 y 35 minutos, tanto para los sueros hiperinmunes de conejo como para los sueros de bovinos.

2.- Establecer un ensayo piloto para buscar el punto de corte utilizando los sueros de bovinos control positivo y negativo.

Los resultados se presentarán en las Figuras 4.9 (sueros de conejo) y 4.9 (sueros de bovino) como la media aritmética de la densidad óptica (con seis réplicas por suero) y diferentes combinaciones de desviaciones estándar para comparar los posibles puntos de corte. Los datos originales se presentan en el apéndice 2, Cuadro A.29-A.31

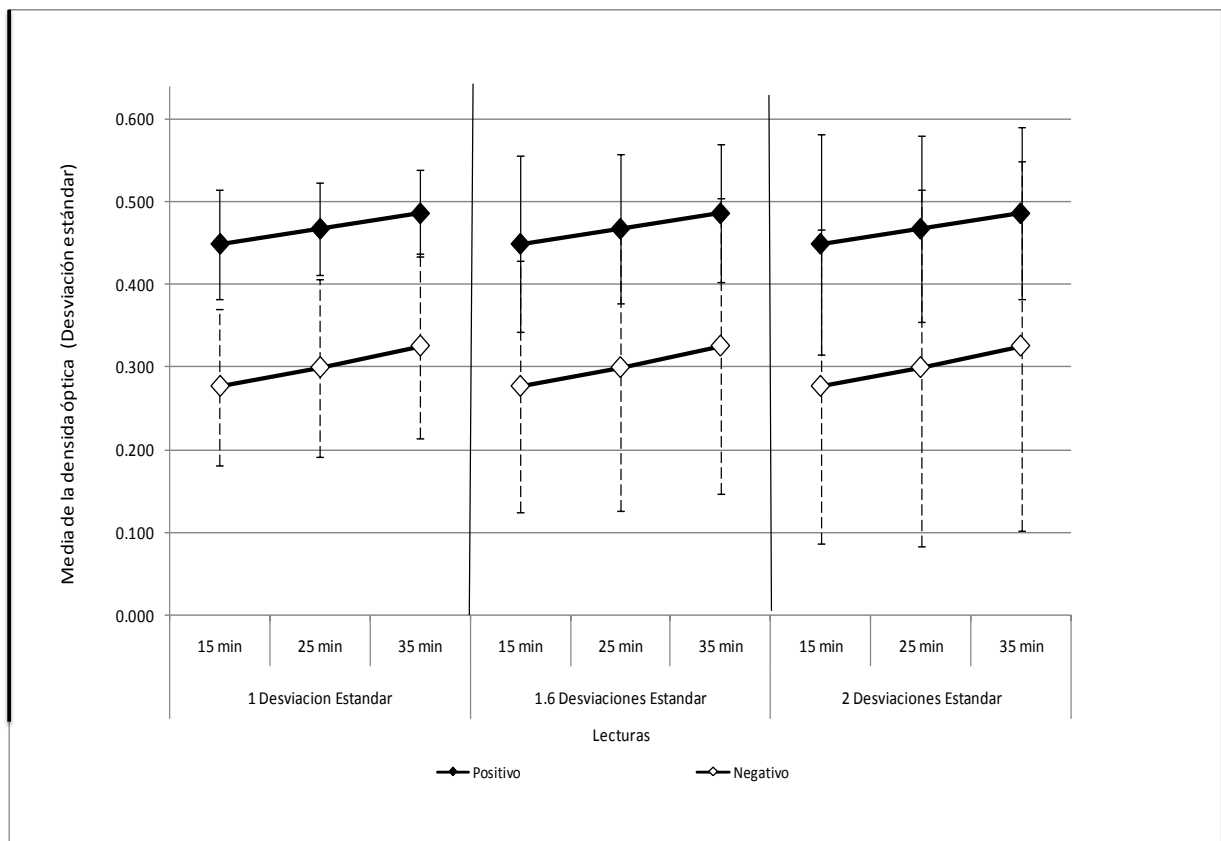


Figura 4.9.-Resultado de la desviación estándar para establecer el punto de corte con sueros de conejo. Mostrado como la media de la densidad óptica a 405 nm y diferentes combinaciones de desviaciones estándar para establecer punto de corte para los sueros testigo de conejo control positivo y negativo con seis réplicas por suero diluido 1:100, con un volumen de antígeno de captura de 2×10^6 Leptospiras/ml de cultivo de *Leptospira interrogans* serovariedad Hardjoprajitno en tres lecturas (15, 25 y 35 minutos).

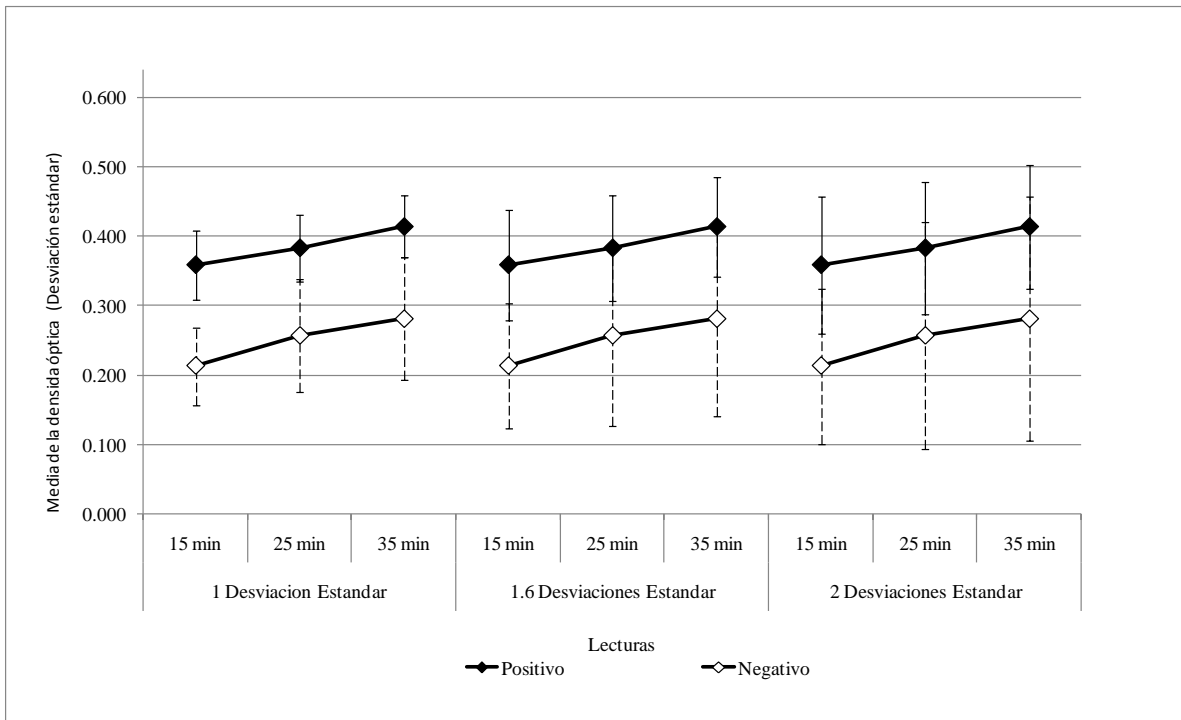


Figura 4.10.-Resultado de la desviación estándar para establecer el punto de corte con sueros de bovino. Mostrado como la media de la densidad óptica a 405 nm y diferentes combinaciones de desviaciones estándar para establecer punto de corte para los sueros de bovino control positivo y negativo con seis réplicas por suero diluido 1:100, con un volumen de antígeno de captura de 2×10^6 *Leptospiras/ml* de cultivo de *Leptospira interrogans* serovariedad hardjoprajitno en tres lecturas (15, 25 y 35 minutos).

4.6 Punto de corte y repetibilidad de ELISA con sueros control de bovino.

Con base en los resultados presentados en el 4.5, se decidió repetir el ensayo con los sueros bovino dos controles positivo control positivo a) con un título por AM de 1:100 y b) con un título por AM de 1:25,000 y negativo con las mismas condiciones incrementando el número de repeticiones...

Las medias y desviaciones estándar (tres desviaciones estándar) para los sueros a, b y c se utilizaron para establecer un punto de corte, donde el resultado varió entre lecturas. Cuadro 4.11 Los datos originales se presentan en apéndice 2, Cuadro A.32-A.34

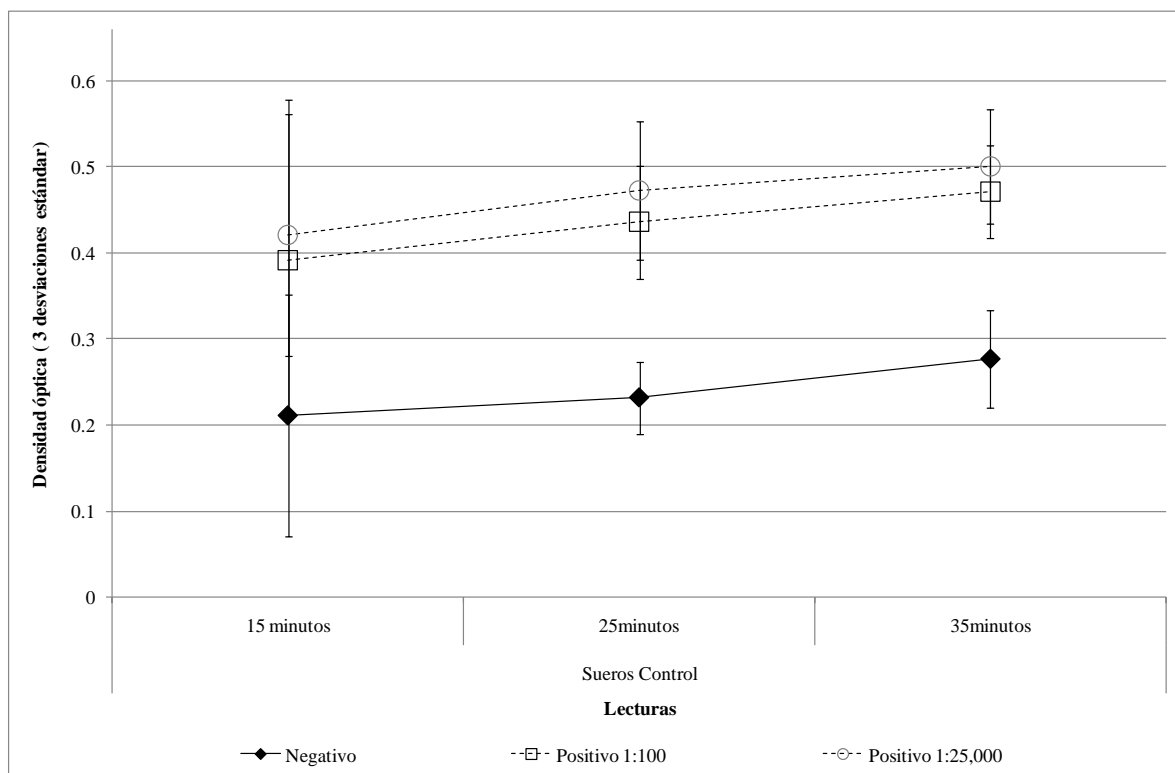


Figura 4.11.- Resultado de diferentes sueros testigo de bovino. Comparación de media de la densidad óptica a 405 nm y tres desviaciones estándar para establecer punto de corte para los sueros bovino control positivo a) 1:100, b) 1:25,000 y c) negativo con 86 y 120 según sea el caso (ver apéndice 2,) réplicas por suero diluido 1:100, con un volumen de antígeno de captura de 2×10^6 *Leptospiras/ml* de cultivo de *Leptospira interrogans* serovariedad hardjoprajitno en tres lecturas (15, 25 y 35 minutos).

Para determinar la repetitividad del ensayo intra-placas, inter-placas y repeticiones se estimó el coeficiente de variación, donde se observó un coeficiente de variación < a 20% para los sueros a, b y c en las lecturas tanto intra-placas como entre-placas (Figura 4.12), lo que permitió estimar que el mejor punto de corte y paso final de estandarización del prueba antes de utilizarle con muestras de población abierta se encuentre en las lecturas de 25 y 35 min.

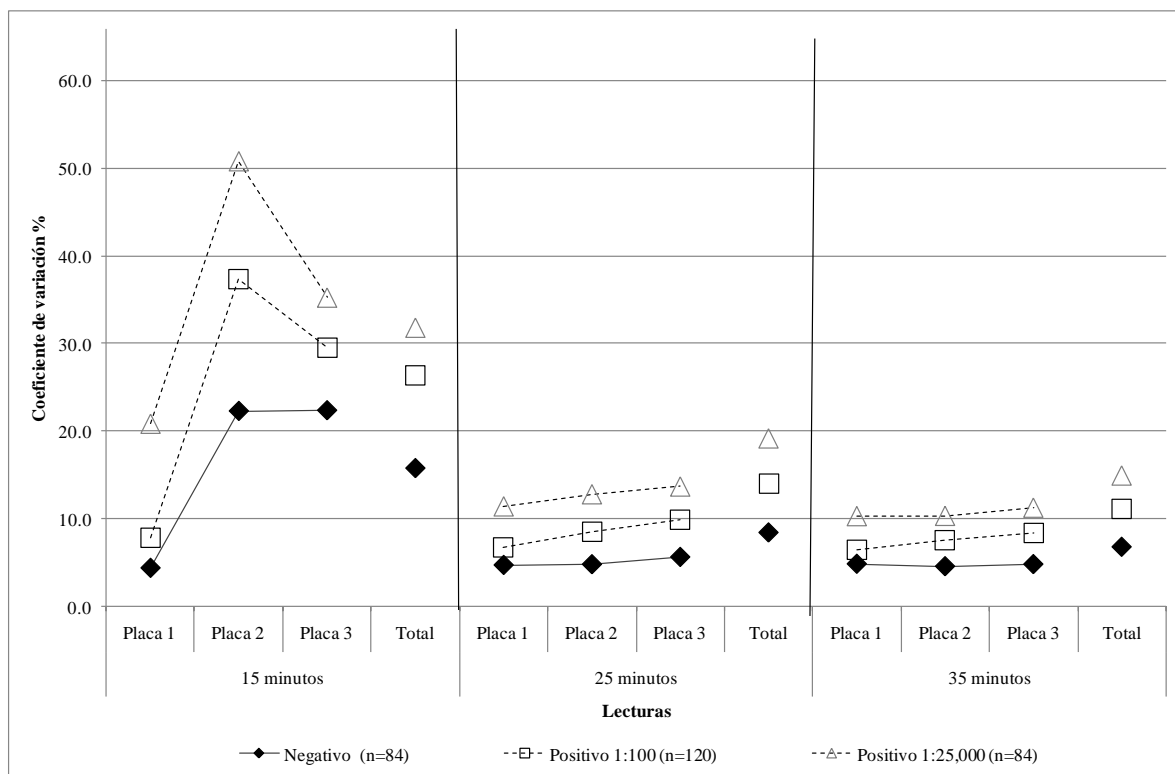


Figura 4.12.- Comparación del coeficiente de variación intra e inter placas para establecer punto de corte para los sueros bovino control positivo a) 1:100, b) 1:25,000 y c) negativo con > 86 réplicas por suero diluido 1:100, con un volumen de antígeno de captura de 2×10^6 Leptospiras/ml de cultivo de *Leptospira interrogans* serovariedad hardjoprajitno en tres lecturas (15, 25 y 35 minutos).

4.7 Evaluación de repetitividad de ELISA para *Leptospira* con sueros de bovino de población abierta.

Utilizando las mismas condiciones identificadas como óptimas para el ensayo de ELISA en los puntos 4.4 y 4.5. Se analizaron 100 sueros de bovinos no vacunados por ELISA, provenientes de hatos con desafío natural de *Leptospira* Hardjo (Figura 4.13) todos los sueros fueron previamente analizados por la prueba de AM con un punto de corte de 1/100 (resultados originales de AM, ELISA y medias aritméticas de la densidad óptica, error estándar y coeficiente de variación se presentan en el Apéndice 2, cuadro A.35-A y B.

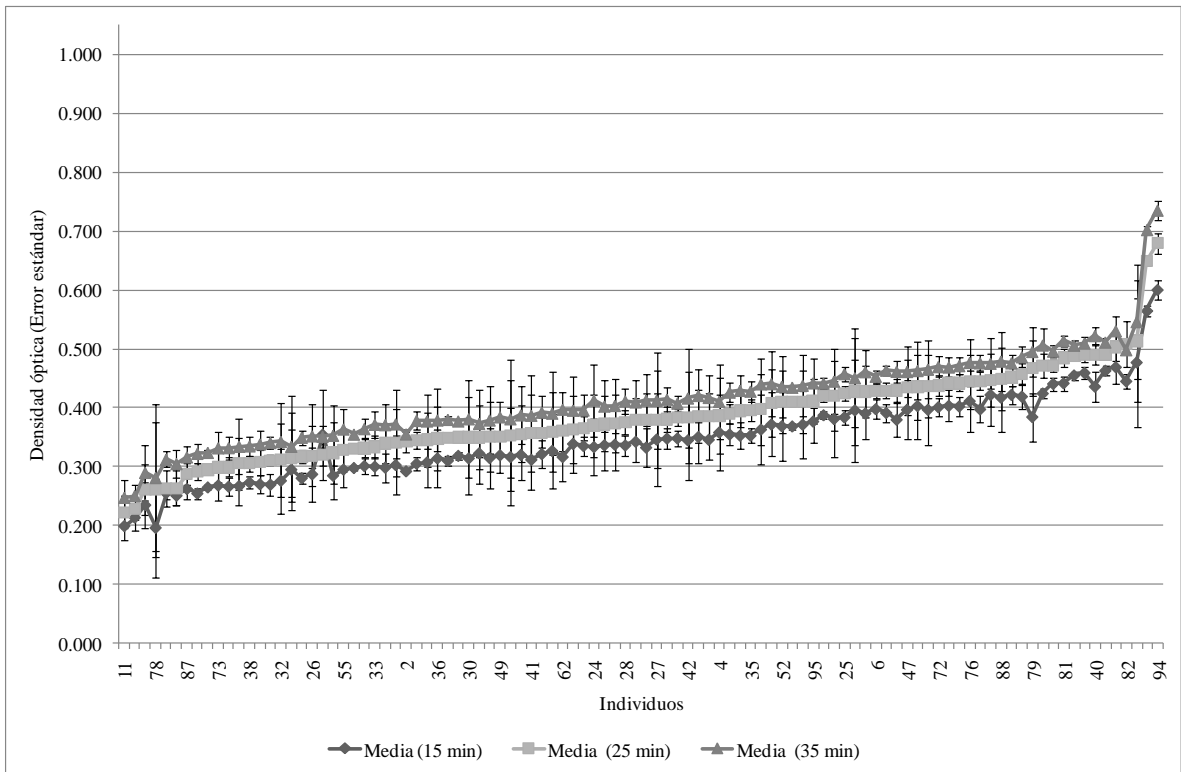


Figura 4.13.- Comparación de media de la densidad óptica de 100 sueros de bovinos. A 405 nm y error estándar para los 100 sueros de bovinos de población abierta con 3 réplicas por suero diluido 1:100, con un volumen de antígeno de captura de 2×10^6 *Leptospiras/ml* cultivo de *Leptospira interrogans* serovariedad hardjoprajitno en tres lecturas (15, 25 y 35 minutos), los datos están ordenados de menor a mayor con base en la media de la lectura a los 25 min.

Para determinar la repetitividad del ensayo intra-placas, inter-placas, se estimó el coeficiente de variación, el cual fue > a 30% para los sueros en las lecturas tanto intra-placas como inter-placas. (Figura 4.14).

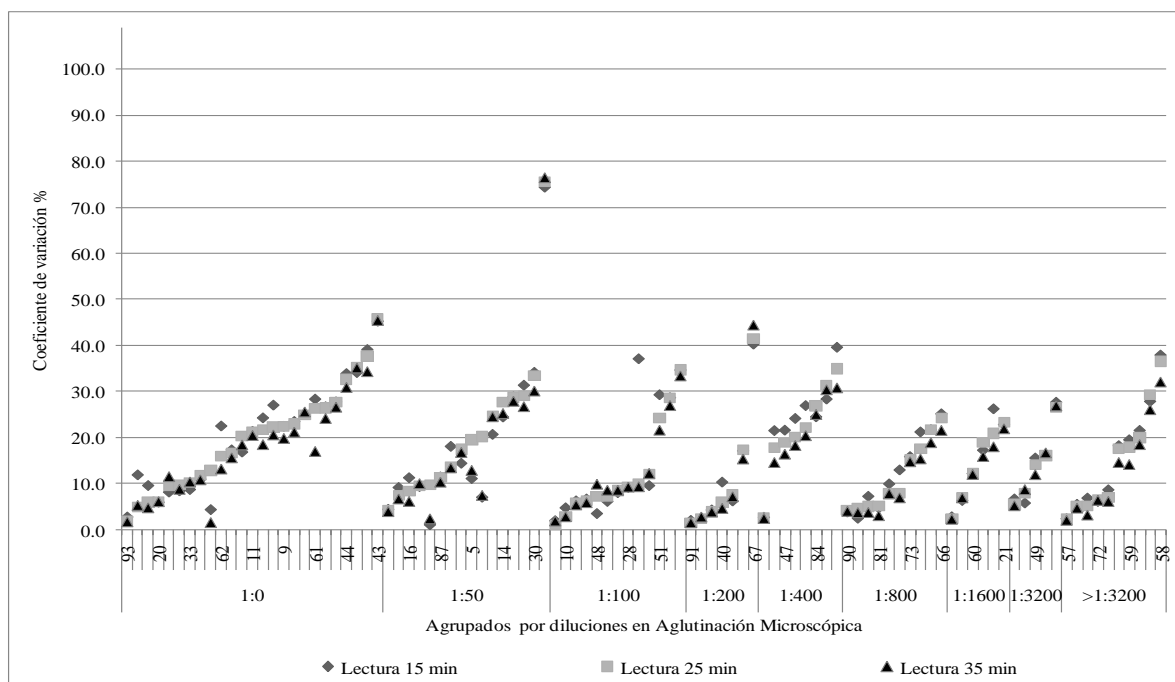


Figura 4.14.- Coeficiente de variación entre réplicas de los 100 sueros de bovinos de población abierta. Agrupados por título de dilución en aglutinación microscópica en tres tiempos de lectura y ordenados de menor a mayor con base en el coeficiente de variación en 25 minutos. Sueros diluido 1:100, con un volúmen de antígeno de captura de 2×10^6 *Leptospiras/ml* de cultivo de *Leptospira interrogans* serovariedad hardjoprajitno en tres lecturas (15, 25 y 35 minutos).

4.8 Comparación de frecuencia relativa de bovinos entre ELISA y AM.

Utilizando los resultados en ELISA de los 100 sueros de bovinos no vacunados (Ver Punto 4.7), donde por la prueba de AM con un punto de corte de 1:100, se estableció la frecuencia relativa 58% (IC 48.3-67.7), utilizando los diferentes puntos de corte en ELISA establecidos en el punto 4.6 como la media de la densidad óptica más 3 desviaciones estándar del suero control negativo en la lectura de 15 min en 0.355 DO, en 25 min en 0.280 DO y en 35 min 0.335 DO para generar una variable dicotómica y poder clasificar positivos y negativos se obtuvieron frecuencia relativas de 40% (IC 30.4-49.6), 94% (IC 89.3-98.7) y 86% (IC 79.2-92.8) respectivamente (Figura 4.15). Se observó una mayor frecuencia relativa con una diferencia estadísticamente significativa al comparar los resultados de AM con las lecturas de 25 y 35 min ($p < 0.0001$) considerándose como una mayor sensibilidad en la prueba de ELISA.

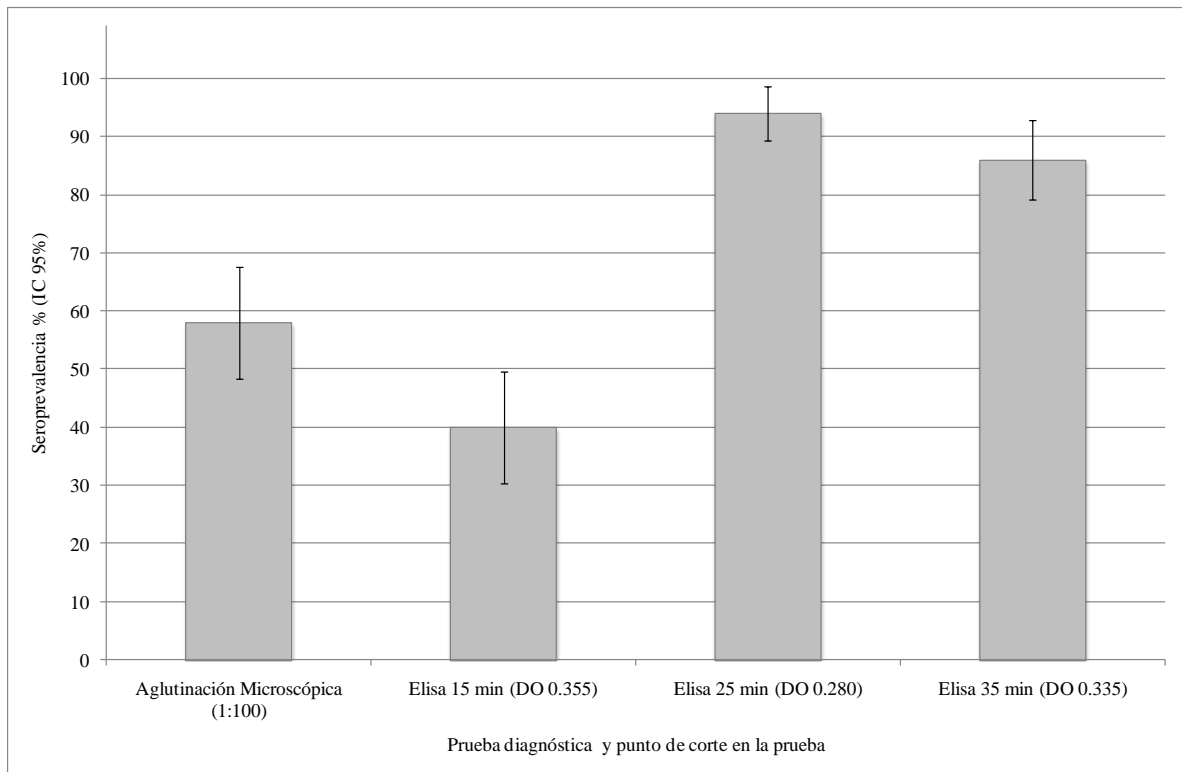


Figura 4.15.- Comparación de frecuencia relativa e intervalo de confianza entre ELISA y AM. Utilizando los resultados de las pruebas de AM (Punto de corte 1:100) y ELISA a tres diferentes tiempos de lectura con respectivo punto de corte con 95% de confianza.

4.9 Análisis comparativo entre los resultados entre ELISA y AM como prueba estándar.

Utilizando las lecturas de la densidad óptica de cada uno de los sueros de bovino en población abierta entre placas dentro de cada una de las lecturas y con el punto de corte correspondiente establecidos en el punto 4.6. de 0.355, 0.280 y 0.335, para las lecturas de 15, 25 y 35 minutos se transformaron los datos a un sistema binomial donde cada lectura era positiva o negativa con respecto a los puntos de corte antes descritos. Con los resultados transformados a un sistema binomial se analizó la precisión de la prueba como el porcentaje de veces que la prueba clasificó a las tres réplicas con la misma clasificación (Clasificación correcta cuando el suero era positivo en las tres lecturas o las tres veces como negativo) y los resultados de los 100 sueros de bovino con sus tres réplicas se presentan en la Cuadro 4.2 datos en el Apéndice 2 cuadro A.35 A y B

Cuadro 4.2.-Precisión: Porcentaje de clasificación correcta o incorrecta en ELISA asociada a punto de corte y tiempo de lectura de los resultados de los cien sueros de bovino con sus tres réplicas.

Lectura	Clasificación %	
	Correcto	Incorrecto
15 minutos	46.0	54.0
25 minutos	73.0	27.0
35 minutos	60.0	40.0

Los resultados obtenidos del análisis estadístico comparativo en cada uno de los tiempos de lectura, para la evaluación comparativa del ensayo de ELISA propuesto en este trabajo y con la prueba estándar de AM, se muestran en el Cuadro 4.3.

Cuadro 4.3.- Análisis comparativo para obtener los valores de las medidas de precisión y acuerdo entre los resultados entre ELISA para *Leptospira interrogans* serovariedad hardjoprajitno con sueros de bovino de población abierta y AM como prueba estándar de oro.

Análisis estadístico	Lecturas (minutos)		
	15	25	35
Exactitud (%)	31.3	58.0	53.0
Acuerdo observado entre pruebas (%)	64.0	64.0	62.0
Acuerdo esperado más allá del azar (%)	48.4	57.0	55.7
Coefficiente Kappa	0.37	0.232	0.217
χ^2 de McNemar, Valor $-p^*$	9.0, <0.01	36.0, <0.001	20.6, <0.001
Sensibilidad (%)	53.0	100	91.0
Especificidad (%)	79.0	14.0	21.0
Valor predictivo positivo (%)	77.5	61.7	61.63
Valor predictivo negativo (%)	55	100	64.29
Proporción de falsos positivos (%)	22.5	38.3	38.37
Proporción de falsos negativos (%)	45	0	35.71

*1 grado de libertad

CAPÍTULO V DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

*"Teoría es cuando se sabe todo y
nada funciona; práctica, cuando todo
funciona y nadie sabe por qué."
Anónimo*

5.1 Discusión

En el presente trabajo se logró desarrollar, estandarizar, evaluar y probar un ensayo inmunoenzimático, para el diagnóstico de leptospirosis en bovinos, con *Leptospira interrogans* serovariedad Hardjoprajitno, mediante la detección de anticuerpos de tipo IgG contra *Leptospira*, esta prueba mostró tener mayor sensibilidad entre 91 y 100 % en comparación con la aglutinación microscópica considerada entre 70 y 90%.^{2,85} Debido a su simplicidad así como la facultad de manejar un gran número de muestras de forma simultánea y el bajo costo con relación a la aglutinación microscópica, la prueba de ELISA representa una alternativa en el sector ganadero para ser utilizada como prueba tamiz en poblaciones con alta frecuencia relativa y de seguimiento a nivel de hato.

Para la realización de esta investigación, se tomó la decisión de utilizar el tipo de ELISA indirecta, la cual es considerada como altamente sensible, según Findlay *et al.*, 2000.¹⁰⁵ La selección del tipo de inmunoensayo depende de si se busca una mayor sensibilidad o especificidad. Cuando la prevalencia de las infecciones es alta, como en el caso de *Leptospira*, se buscan herramientas diagnósticas que tengan la capacidad de detectar a la mayoría de los individuos positivos, es decir que tengan una alta sensibilidad.^{33, 58,76}

La especificidad del inmunoensayo radica en la detección de la reacción antígeno-anticuerpo, donde variaciones en la presentación estructural del antígeno tiene un impacto sobre la precisión y sensibilidad con que el anticuerpo puede reconocerle, reflejándose en la eficacia del inmunoensayo como herramienta diagnóstica.¹⁰⁵ En el desarrollo de un ELISA siempre se debe de considerar la potencial pérdida de epítomos, tanto en el manejo físico-químico de los antígenos para su obtención como en el proceso de adsorción a la placa de poliestireno.^{103, 105} Con base en lo anterior, la primera etapa para la propuesta de un inmunoensayo para diagnóstico fue el explorar diversas modalidades en la presentación de los antígenos buscando que el anticuerpo proveniente del animal con un desafío antigénico tuviera la capacidad de evidenciar una respuesta inmune. Por lo que se seleccionaron como posibles antígenos de captura dos opciones: Leptospiras totales provenientes de un cultivo inactivado de *Leptospira interrogans* Hardjoprajitno, donde la propuesta de trabajo se basó en la detección del LPS que es el antígeno de superficie más abundante en la membrana de *Leptospira*;³ por otro lado, la utilización de extractos de membrana externa se seleccionó debido a la variedad de proteínas estructurales y funcionales presentes entre ellas. Las lipoproteínas (LipL32 > LipL21 > LipL41) son relativamente abundantes en la superficie y han demostrado tener capacidad inmunogénica según lo reportado en los ensayos de Cullen *et al.*, (2003⁹⁵ y 2005¹¹⁰), Matsunaga *et al.*, (2003),⁹⁶ y Haake *et al.*, (2005).¹⁰⁹

De los modelos de antígenos de captura utilizados en este trabajo y con base en los resultados obtenidos se concluyó que el método con leptospiras completas permite establecer las condiciones adecuadas para el buen discernimiento en el serodiagnóstico de leptospirosis bovina. En segundo término, el método con extractos de membranas resultó ser impráctico, incosteable y de baja confiabilidad, por lo cual, se decidió no continuar con la experimentación de este modelo; sin embargo, se discute de manera puntual en el Apéndice 3.

Se utilizó para estandarización del ELISA un cultivo inactivado a 56°C durante 30 minutos de *Leptospira interrogans* serovariedad Hardjo (Hardjoprajitno),⁸¹ el objetivo de este procedimiento fue obtener una fuente de bacterias inactivadas con el menor impacto sobre la integridad de las estructuras de membrana externa. La membrana externa está formada por una bicapa de fosfolípidos y es una estructura altamente conservada en leptospiras, contiene múltiples lipoproteínas, proteínas de sistemas de secreción y lipopolisacárido (LPS).⁴⁸ El LPS es el principal antígeno de superficie, se encuentra anclado a la membrana externa y se encarga de conferir la especificidad antigénica.^{2, 44, 45, 46}

Existen proteínas estructurales y funcionales en *Leptospira* donde la mayor parte de ellas son lipoproteínas y han demostrado tener capacidad inmunogénica.^{50, 108} Cullen *et al.*, (2003⁹⁵ y 2005¹¹⁰), Matsunaga *et al.*, (2003),⁹⁶ Haake *et al.*, (2005),¹⁰⁹ han reportado la utilización de extractos de membrana como antígenos de captura en diversos inmunoensayos.¹⁰⁹

La metodología para estandarizar la prueba de ELISA se realizó mediante el uso de diferentes concentraciones de los antígenos de captura, frente a diferentes diluciones de sueros testigo y así lograr identificar las condiciones físico-químicas adecuadas para el ELISA. Dado que no se contaba con antisueros de referencia internacional de bovino y conejo, que pudiesen funcionar como sueros testigos positivos y negativos como lo indica la OIE, se produjeron sueros inmunes contra *Leptospira interrogans* serovariedad Hardjoprajitno en conejo (Ensayos 4.4.1 al 4.4.3).

El protocolo utilizado para la producción de sueros testigo demostró ser efectivo e incluyó la inoculación vía subcutánea en la región dorsal del conejo los días 0, 4, 7, 21 y 28 donde los conejos recibieron como antígeno leptospiras totales inactivadas adicionados con carbopol como adyuvante. Semejante a lo reportado por Basurto (2005)⁹⁹ en ratón de laboratorio y Rodríguez-Reyes (2007)⁴² en conejo. Como evidencia de la respuesta específica al antígeno en conejos inmunizados se demostró la seroconversión a partir del estado seronegativo de los animales al inicio del esquema a títulos finales de 1:200 y 1:400 en aglutinación microscópica. Sin embargo, comparando niveles en la producción de anticuerpos aglutinantes anti-*Leptospira* en conejo, obtenidos con protocolos tradicionales para la producción de anticuerpos policlonales de referencia, donde los animales reciben el estímulo antigénico por la vía intravenosa con la utilización de cultivos vivos y muertos,

la producción detectada por prueba de aglutinación microscópica en presente trabajo es inferior, a pesar de estos fueron adecuados para permitir la estandarización del inmunoensayo.¹¹³

Se realizó una serie de 8 ensayos (5 de ellos con sueros testigo de conejo y 3 finales con suero testigo de bovino) con tres réplicas en cada uno obteniéndose como condiciones óptimas: a) antígeno fijo en placa volumen de 2×10^6 Leptospiras/ml, de cultivo de *Leptospira interrogans* serovariedad Hardjoprajitno con una cuenta aproximada de 2×10^8 células/ml b) sueros (testigo o de campo) con la dilución de trabajo 1:100 y c) lectura de densidad óptica a 405 nm a los 15, 25 y 35 minutos. Los resultados en cada ensayo fueron evaluados como medias aritméticas de las lecturas de densidad óptica. Una vez realizado el análisis de acuerdo entre pruebas (Punto 5.7) se demostró mayor sensibilidad (100%), valor predictivo negativo (100%) y un porcentaje más alto de clasificación precisa (73%) se obtuvo en la lectura de 25 minutos seleccionando ésta como el tiempo de lectura colorimétrica más adecuada de los resultados cuando se comparo con los resultados de Aglutinación Microscópica.

Con los sueros testigo de bovino diluidos 1:100 se procedió a desarrollar ensayos con más de 80 réplicas de cada suero en diferentes placas, obteniendo un coeficiente de variación <20% para los sueros en las lectura tanto intra-placas como inter-placas lo que permitió demostrar la repetitividad y estabilidad del ensayo.^{85, 103, 104} Dohoo *et al.*, (2003)¹⁰⁴ y OIE (2004)⁷⁹ indicaron que coeficientes de variación inferiores al 20% representan una reproducibilidad adecuada en el ensayo.⁸⁵

La precisión es la capacidad de un ensayo de dar el mismo resultado cuando esta es repetida en bajo las mismas condiciones. Para lo que se probaron 100 muestras de campo y se determinó la repetitividad del ensayo intra-placas e inter-placas con tres réplicas de cada suero lo cual dio como resultado un coeficiente de variación < a 30% inter-placas y <20% intra-placas, indicando una buena repetitividad del ensayo con muestras de población abierta y su posible utilidad en el diagnóstico de campo. La OIE (2004)⁷⁹ considera como valor crítico de repetitividad de un ensayo entre diferentes réplicas un coeficiente de variación >30%.

Para llevar a cabo valoraciones de la sensibilidad, especificidad y establecer la frecuencia relativa, los resultados de las pruebas tienen primero que reducirse a la categoría de positivo o negativo. Esto implica considerar un punto de corte (umbral o límite de decisión) en la escala continua (para este estudio, media de la densidad óptica) de los resultados de la prueba (OIE 2004).⁷⁹

El establecimiento de un resultado positivo o negativo asociado a la lectura de densidad óptica en la prueba de ELISA, se determina con base en la media de los sueros testigo positivos o negativos, $\pm 1.6, 2$ ó 3 desviaciones estándar, siendo la más común 2 desviaciones estándar.^{102,103}

Thrusfield (2005) ¹⁰³ indica que la elección del punto de corte con base al número desviaciones estándar es arbitraria dentro de los parámetros antes señalados.

El punto de corte en la prueba de ELISA se estableció con los sueros testigo de bovino para generar una variable dicotómica y clasificar positivos y negativos a los sueros problema a estudiar. El punto de corte positivo se obtuvo como la media más 3 desviaciones estándar del suero control negativo. En la lectura de 15 min el punto de corte se consideró a partir de 0.355 densidades ópticas, en 25 min 0.280 y en 35 min 0.335.

Para estandarizar, establecer el punto de corte y probar el ELISA con sueros de bovino se seleccionó un suero testigo negativo y dos de animales expuestos a *Leptospira* en forma natural, con títulos uno de 1:100 y otro de 1:25,000 en la prueba de aglutinación microscópica. Los sueros provenían de animales no bacterinizados contra *Leptospira*, de hatos de bovinos de re-cría al pastoreo.¹⁰⁰ La OIE (2004) ⁷⁹ indica que dentro del proceso de estandarización y validación de un inmunoensayo se deben incluir estándares internos como un suero testigo positivo de títulos bajos, uno de títulos altos, así como suero testigo negativo, estos son utilizados para las estimaciones de repetitividad y establecimiento del punto de corte en el uso rutinario del ELISA. Los sueros testigo deben provenir de poblaciones de animales de referencia: estos pueden ser animales infectados o expuestos y animales no infectados o no expuestos. La selección de animales de referencia exige que provengan de una población similar a la población donde será aplicada.⁷⁹

Utilizando los resultados de frecuencia relativas que se obtuvieron del análisis de los 100 sueros de bovinos, por la prueba de aglutinación microscópica, se estableció una frecuencia relativa del 58% (IC 48.3-67.7) y en el ELISA en sus tres diferentes tiempos de lecturas (15, 25, 35 minutos) de 40% (IC 30.4-49.6), 94% (IC 89.3-98.7) y 86% (IC 79.2-92.8). El ensayo de ELISA demostró mayor sensibilidad que la aglutinación microscópica, en las lecturas a 25 y 35 minutos; donde se detectó la menor variabilidad y más alta repetitividad. Existe un número considerable de reportes en los cuales se compara la detección de anticuerpos anti-leptospira por ELISA y aglutinación microscópica, en donde los ensayos inmunoenzimáticos han demostrado una mayor sensibilidad que la aglutinación microscópica.¹¹⁸

La prueba definitiva de la presencia del microorganismo en un individuo es el aislamiento. Sin embargo, la eficiencia de cultivo en condiciones óptimas es menor al 17% y es un proceso de largo tiempo, lo cual representa un trabajo laborioso y de alto costo por lo que para el caso de diagnóstico de leptospirosis la prueba reconocida como estándar o “prueba de oro” es la aglutinación microscópica.² La cual en particular es la única que puede identificar al nivel de serovariedad en forma directa y es una prueba de alta especificidad, pero donde su sensibilidad puede variar desde 70 hasta 95% dependiendo tipo de serovariedad a evaluar, ciclo epidemiológico y

especie animal.^{2, 33, 85} Existen diversas publicaciones que han comparado en forma particular el desarrollo de pruebas de ELISA para *Leptospira* serovariedad Hardjo y aglutinación microscópica con la misma serovariedad. En la mayor parte de estos reportes al igual que los resultados obtenidos en el presente trabajo se obtuvieron sensibilidades más altas en ELISA que en aglutinación microscópica, en tanto a nivel de especificidad y concordancia de la prueba se reportan en algunos valores semejantes a los obtenidos en este trabajo.^{113, 114, 115, 116, 118}

Tradicionalmente, cuando se establece una prueba diagnóstica nueva, esta debe ser comparada con la que se reconoce como “prueba de oro”. Sin embargo, en muchas ocasiones como es el caso de *Leptospira* esta prueba de oro no es perfecta o puede presentar problemas en su evaluación y en la interpretación de resultados.¹⁰⁴ Se realizó un análisis estadístico comparativo para obtener los valores de las medidas de precisión y acuerdo entre los resultados de ELISA para *Leptospira* con sueros de bovino de población abierta y aglutinación microscópica como prueba estándar de oro.

La precisión es la habilidad de una prueba para dar el mismo resultado cuando esta es repetida bajo las mismas condiciones, expresa la capacidad de proporcionar el mismo resultado de una misma muestra cuando esta se repite. Para el ensayo de ELISA se encontró que el porcentaje más alto (73%) de clasificación precisa se obtuvo en la lectura de 25 minutos concluyendo que este es el tiempo óptimo desarrollado. Existen factores que pueden intervenir en la precisión como son factores de tipo biológico, duración de la respuesta inmune a la infección, tipo y forma de la infección clínica o subclínica, aguda o crónica, edad, antecedentes de vacunación, entre otros; o factores atribuibles al procesamiento de las pruebas y/o manejo de las muestras como se ha discutido anteriormente.⁸⁵

Análisis estadístico: cuando se evalúa el acuerdo entre dos pruebas diagnósticas o entre la prueba estándar y otras pruebas debe de demostrarse que el acuerdo obtenido entre cada una de estas no se presente por azar. El análisis estadístico de elección para el acuerdo entre elementos a evaluar como pueden ser pruebas es el llamado coeficiente kappa. Existen algunos elementos otros dentro del índice Acuerdo observado entre pruebas (%), y Acuerdo esperado más allá del azar. Para el presente trabajo se obtuvieron valores en el rango del 60% para el primero y entre 48 y 57% para el segundo indicando un acuerdo moderado entre ambas pruebas a ser evaluadas.¹⁰⁴ El coeficiente Kappa es un método estadístico para medir el acuerdo entre dos pruebas diagnósticas en una clasificación dicotómica (positivos, negativos), estima la concordancia mas allá de lo esperado por casualidad. Los obtenidos para el acuerdo en entre el ELISA y Aglutinación Microscópica se encontraron en el

rango de 0.21 a 0.37, en el coeficiente Kappa valores entre 0.21 a 0.40 se consideran como un acuerdo aceptable entre pruebas, el resultado al comparar la aglutinación microscópica con ELISA en sus tres tiempos se ubicó en este rango. ^{104, 117}

La χ^2 de McNemar, prueba la hipótesis de si la proporción de positivos en la prueba de oro es diferente de la proporción en la prueba alternativa o prueba de comparación y se interpreta, donde un valor de $p > 0.05$ (no significativo) indica que la proporción de positivos en ambas pruebas no es diferente y por lo tanto se asume una alta concordancia entre pruebas. ^{104, 117} Los resultados de las pruebas de McNemar para la comparación entre los resultados de aglutinación microscópica y ELISA en sus tres lecturas fue $p < 0.01$. Los valores obtenidos en el coeficiente Kappa indicaron un acuerdo moderado, en tanto a la prueba de McNemar indicó que las proporciones son diferentes, apoyando la observación de una mayor sensibilidad en la prueba de ELISA estandarizada con lectura a 25 y 35 min (100% y 91%) comparada con la aglutinación microscópica considerada entre 70 y 90%, o la lectura de 15 minutos figura 4.15 y tablas 4.2 y 4.3. ^{2, 85}

La exactitud tiene dos componentes importantes sensibilidad y especificidad. ^{103, 104} Los resultados de exactitud (tabla 4.3), indicaron que el tiempo óptimo de lectura del ensayo fue 25 minutos, a pesar de que a nivel de frecuencia relativa no existió diferencia estadística con el ensayo en su lectura a 35 minutos ($p < 0.05$) (punto 4.8).

En la exactitud y la validación los valores de sensibilidad y especificidad diagnóstica constituyen los parámetros más importantes que deben tomarse en cuenta al establecer un ensayo diagnóstico. Especificidad es la capacidad de la prueba de detectar animales verdaderamente negativos. Cuando se compara una propuesta de prueba diagnóstica contra una prueba estándar, el porcentaje de sensibilidad esta dado como la proporción de individuos verdaderamente infectados positivos en ambas pruebas y la especificidad será el mismo caso para los individuos clasificados como negativos o sanos por ambas pruebas. El resultado observado en el presente trabajo fue el de una sensibilidad mayor en ELISA con lecturas de 25 y 35 min, que en la prueba de aglutinación microscópica, en tanto la especificidad, al compara ambas pruebas resulto ser inferior a la de aglutinación microscópica. ^{103, 104}

La divergencia en los resultados de sensibilidad y especificidad entre ambas pruebas pueden ser atribuidos al formato de cada prueba, la prueba de aglutinación microscópica detecta principalmente

anticuerpos de la clase IgM y en segundo término a los de la clase IgG, en tanto el formato elegido para el desarrollado del ELISA en el presente trabajo para la detección de la clase IgG.²

La población de bovinos de donde se seleccionaron las muestras, presenta evidencias de una condición de alta prevalencia, es decir que probablemente tuvieron un desafío natural por *Leptospira* desde edades muy tempranas y en forma continua.¹⁰⁰ Generalmente las inmunoglobulinas de la clase IgM aparecen en la fase temprana de la infección y las de la clase IgG corresponden a una respuesta humoral secundaria o de memoria.⁸³ El resultado de la prueba de aglutinación microscópica es evaluada en forma visual, la forma de determinar la reacción antígeno-anticuerpo es menos precisa y sujeta a mayor variabilidad entre cada individuo que realice la lectura, lo cual se refleja en variación en la interpretación del punto de corte. En tanto el inmunoensayo es evaluado a través de la reacción colorimétrica evaluada en un equipo de precisión, lo que permite una determinación más precisa de la unión antígeno-anticuerpo. Con base en lo anterior, se propone la hipótesis de que las diferencias en el acuerdo encontradas entre ambas pruebas estas pueden estar dadas por el tipo de inmunoglobulina que se reconoce la mayor capacidad y precisión de la ELISA para detectar la presencia de inmunoglobulinas.

Cuando se evalúa una prueba diagnóstica no solo se requiere conocer la sensibilidad y la especificidad, se necesita también que el resultado de la prueba refleje verdaderamente la condición clínica del individuo (positivo o negativo). El valor predictivo positivo es la probabilidad de que un individuo con resultado positivo sea auténticamente positivo así como la probabilidad de que un individuo con resultado negativo sea auténticamente negativo. Estos valores a pesar de estar ligados a la sensibilidad y especificidad de la prueba van a variar dependiendo de la prevalencia del proceso infeccioso en la población y el origen de los individuos^{103, 104} Los valores predictivos positivos comparando la aglutinación microscópica contra el ELISA se mantuvieron alrededor del 60% en cambio el valor predictivo negativo fluctuó: en la lectura de 25 minutos del 100% y en la lectura a 35 minutos de 64%. Los resultados de los valores positivos y negativos de sensibilidad y especificidad al comparar ambas pruebas permiten definir el punto óptimo de lectura en 25 minutos y sugerir que el ensayo diagnóstico indirecto propuesto en la investigación puede ser utilizado como una prueba, de alta sensibilidad, con un alto valor predictivo, las cuales son características significativas de una prueba diagnóstica cuando se estudia un caso de prevalencia relativamente alta, como es el caso de la leptospirosis en bovinos, donde se busca detectar el mayor caso de animales positivos y reducir el número de animales negativos.^{85, 103, 104}

5.2 Prospectivas

Realizar ensayos similares utilizando la 12 serovariedades de referencia utilizadas tradicionalmente para el diagnóstico de Leptospirosis.

Desarrollar esta técnica diagnóstica en otras especies domésticas y de producción.

Establecer la reproducibilidad de este ensayo mediante la utilización de un número mayor de sueros problema de campo.

Realizar estudios de los protocolos de extracción de membranas y su conservación de epítomos para el establecimiento de nuevos antígenos de captura.

Desarrollar ensayos similares con Inmunoglobulinas de tipo IgM o bien con ambas inmunoglobulinas.

Realizar ensayos inmuno enzimáticos de tipo sándwich o competitivo para tener una mayor especificidad.

5.3 Conclusiones

- La utilización de leptospiras totales demostró ser el mejor antígeno de captura donde se considera que la reacción primariamente estuvo mediada por el LPS.
- Los protocolos utilizados para la extracción de PME y proteínas recombinantes como posibles antígenos de captura para el ensayo diagnóstico mostraron que se requiere una metodología mas específica que la planteada inicialmente en el proyecto por lo cual no fue posible alcanzar los objetivos planteados al inicio de la investigación.
- El lograr estandarizar las condiciones físico químicas y ambientales adecuadas para el ensayo de ELISA fue un proceso que requirió un análisis crítico de los resultados en cada ensayo planteado lo cual se reflejo en un largo proceso de estandarización para el establecimiento de un ensayo diagnóstico, funcional con buena repetibilidad y validación y su uso con pruebas de campo.
- Se logro estandarizar un ensayo de ELISA para uso diagnóstico que demostró un acuerdo aceptable con la prueba de oro.
- El ensayo demostró tener mayor sensibilidad que AM.
- El muestreo en sueros de bovino confirmo el estado de alta prevaecía de la población de origen anteriormente reportada por AM.

CAPÍTULO VI

LITERATURA

CITADA

"Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano". Isaac Newton

1. Bharti A, Nally J, Ricaldi J, Matthias M, Diaz M, Lovett M, Levett P, Gilman R, Willing M, Gottuzo E, Vinetz J. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 757-771.
2. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 296-326.
3. Faine S, Adler B, Bolin C, Petrolat P. *Leptospira* and Leptospirosis 2a ed. Melbourne, Australia: M Sci, 1999.
4. Inada R, Hoki IY, Kaneko R, Ito R. Etiology, mode of infection and specific therapy of Weil's disease. *J Exp Med* 1916; 23: 377-402.
5. Kitamura H, Hara H. Über den Erreger von "Akiyami" Tokio Iji Shinshi Tokyo. *Medical Journal* 1918: 2056-2057.
6. Uhlenhuth P, Fromme W. Experimentelle Untersuchungen über die sogenannte Weilsche Krankheit (ansteckende Gelbsucht). *Med Klinik* 1915; 44: 1264 -1296.
7. Costa S, Triosier J. Persistence dans le sèrum *in vitro* de la substance immunisante de la *spirochetose ictero-haemorrhagique*; diagnostic retrospectif. *Comptes Rendues des Sceances de la Societe de Biologie et de ses Filiales* 1917; 80: 449-451.
8. Jacobsthal E. Die Agglomeration der Spirochäte der Weilschen Krankheit druch Rekonvaleszentenserun. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 1917; 43: 349-353.
9. Ido Y, Hoki R, Ito H, Wani H. The profilaxis of Weil`s disease (*Spirochaetosis icterohaemorrhagica*). *J Exp Med* 1916; 28: 435-448.
10. Ido Y, Hoki R, Ito H, Wani H. The prophylaxis of Weil`s disease (*Spirochaetosis icterohaemorrhagica*). *J Exp Med* 1916; 24: 471-483.
11. Uhlenhuth P, Fromme W. Experimentelle Untersuchungen über die Infektionsmodus, die Epidemiologie and Serumbehandlung der Weilschen Krankheit (Icterus infectiosus) II Mitteilung. *Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie I Originale* 1919: 28- 31.
12. Kaneko R, Morihana S. Untersuchungen über die Identität der *spirochaeta icterohaemorrhagiae* (inada and ito) und der *Spirochaeta icterogenes* (unlenhuth und Fromme) und über das Verhalten der *spirochaeta hebdomadis*, des Erregers des Siebentagfiebers (Nanukayami) gegenüber der *spirochaeta icterogenes*. *Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie I Originale* 1921; 31: 201-221.
13. Uhlenhuth P, Zülzer M. Über die biologischen und immunisatorischen Beziehungen des Erregers der Weilschen Krankheit (*spirochaeta icterogenes*) zu der freilebenden Wasserspirochäte (*spirochaeta pseudoicterogenes*). *Zugleich ein Beitrag zum Virulenzproblem Klinische Wochenschrift* 1922; 2: 2124- 2130.

14. Van der Hoeden J. Epizootiology of Leptospirosis. Adv Vet Sci 1958; 4: 278-339.
15. Klarenbeek A, Schüffner W A. Het voorkomen van een afwijkend leptospira-ras in Nederland. Ned Tijdschr Geneesk 1933; 77:4271-4276.
16. Timoney J F, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE. The Spirochetes. In: Hagan, Bruner's. Microbiology and infectious diseases of domestic animals. 8^a ed. Ithaca, USA: Comstock Publishing Associates 1988.
17. Freund S, Trainin D, Malkin E. Contagious jaundice in cattle. Palest Vet Bull 1941; 8:153-155.
18. Ellis WA, Songer JG, Montgomery J, Cassells JA. Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar hardjo in the genital and urinary tracts of non-pregnant cattle. Vet Rec 1986; 118: 11-13.
19. Noguchi H. *Leptospira Icteroides* and Yellow Fever. Proc Natl Acad Sci U S A 1920; 6: 110-111.
20. Erosa-Barbachano A. Leptospirosis. Rev Biomed 2001;12: 282-287.
21. Gastelum BF. Fiebre icterohemorrágica en el estado de Sinaloa. X Congreso de Medico Nacional 1933.
22. Varela G, Zavala J. Estudios serológicos de leptospirosis en la República Mexicana. Rev Inst Salubr Enferm Trop 1961; 31: 49-52.
23. Mendoza HP, Méndez VG. Estudios de leptospirosis en la ciudad de México. Rev Inst Salud Enf Trop 1958; 18: 37-39.
24. Varela G, Palencia L, Gonzalez R, Vazquez A. Effect of synnematin on experimental *Leptospira icterohaemorrhagiae* infection in guinea pigs. Rev Inst Salubr Enferm Trop 1954; 14: 215-217.
25. Luna-Alvarez M, Moles-Cervantes P, Torres-Barranca J, Salazar G, Urrutia V, Nava V. Leptospirosis canina, en Memorias Simposio internacional sobre *Leptospira* y Leptospirosis en las Américas 2004: México DF.
26. Organización Mundial de la Salud. El control de las Enfermedades Transmisibles. Decimoséptimo edición Publicación Científica y Técnica # 581 OPS 2001.
27. Levett PN, Matthias MA, Galloway R J, Steigerwalt RL, Vinetz AG. Isolation and characterization of a new *Leptospira* species from man and animals in the Peruvian Amazon. 5th meeting of the international leptospirosis society 2007; Quito Ecuador 28: 17-20.

28. Levett PN, Adler B, Hartskeerl R, Smythe L. Recent taxonomic changes in the genus *Leptospira* 5th meeting of the international leptospirosis society. Quito Ecuador: International leptospirosis society 2007: 17-20
29. Euzéby JP. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Leptospira* 2002 disponible en: <http://www.bacterio.cict.fr/l/leptospira.html> 2002
30. Ristow P, Bourhy P, Kerneis S, Schmitt C, Prevost MC, Lilenbaum W, Picardeau M. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiology* 2008; 154: 1309-1317.
31. Quinn PJ, Markey B, Carter ME, Donnelly WJ. *Veterinary microbiology and microbial disease*. England: Blackwell Science 2002
32. Bulach DM, Kalambaheti T, de la Peña-Moctezuma A, Adler B. Functional analysis of genes in the *rfb* locus of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo subtype Hardjobovis. *Infect Immun* 2000; 68: 3793-3798.
33. Bolin AC, Prescott JF. Leptospirosis. In: Howard JL, Smith RA. *Current Veterinary Therapy*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders 2002: 325-358.
34. Nauman KR, Holt S, Cox CD. Purification, ultrastructure and composition of axial filament from *leptospira*. *J Bacteriol* 1969; 98: 264-280.
35. Trueba GA, Bolin CA, Zuener RL. Characterization of the periplasmic flagellum proteins of *Leptospira interrogans*. *J Bacteriol* 1992; 174: 4761-4768.
36. Greene CE, Shott E. Leptospirosis. In: Greene CE, *Infection diseases of the dog and cat*. Saunders Philadelphia 1990: 498-500
37. Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson PJ, Kuczek ES, Bommezzadri S, Davis JC, McGrath A, Johnson M.J, Boursaux-Eude C, Seemann T, Rouy Z, Coppel RL, Rood JI, Lajus A, Davies JK, Me´digue C, Adler B. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of Leptospirosis. *PLoS ONE* 2008; 3:1607-1617.
38. Picardeau M. Conjugative Transfer between *Escherichia coli* and *Leptospira spp* as a New Genetic Tool. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 319-322.
39. Xue F, Yan J, Picardeau M. Evolution and pathogenesis of *Leptospira spp*: Lessons learned from the genomes. *Microb Infect*, doi 2009; 10: 1016-1020.
40. Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng, R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF, Jiang HQ, Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z, Sheng HH, Yin HF, Zhang Y, Zhu GF, Wan M, Huang HL, Qian Z, Wang SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QC, Guo XK, Danchin A, Saint GI, Somerville RL, Wen YM, Shi MH, Chen Z, Xu J G,

- Zhao GP. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 2003; 422: 888-893.
41. Nascimento A, Almeida V, Van Sluys MA, Monteiro-Vitorello B, Camargo LEA, Digampietri LA, Harstkeerl RA, Ho PL, Marquez MV, Oliveira MC, Setubal JC, Haake DA, Martins EA. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. *Braz Jour Med Biol Res* 2004; 37: 459-478.
 42. Rodríguez-Reyes E A. Antigenicidad de la proteína de membrana externa GspD_L, supuesta secretina del T2SS de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjobovis). (Tesis Doctorado), México DF: UNAM 2007
 43. Alcaraz-Sosa LE. Detección de la expresión de la secretina GspD_L, del sistema de secreción tipo 2 (T2SS) de *Leptospira*, mediante inmunohistoquímica. (Tesis Maestría), México, DF: UNAM, 2007
 44. Midwinter A, Faine S, Adler B. Vaccination of mice with lipopolysaccharide (LPS) and LPS-derived immuno-conjugates from *Leptospira interrogans*. *J Med Microbiol* 1990; 33: 199-204
 45. De la Peña-Moctezuma A, Bulach D M, Adler B. Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* subtype Hardjobovis. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 177: 319-326.
 46. De la Peña-Moctezuma A, Bulach DM, Kalambaheti T, Adler B. Genetic differences among the LPS biosynthetic loci of serovars of *Leptospira interrogans* and *Leptospira borgpetersenii*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; 31: 73-81
 47. Isogai E, Isogai H, Fujii N, Oguma K. Macrophage activation by leptospiral lipopolysaccharide. *Int J Med Microbiol* 1990; 273: 200-208.
 48. Haake DA, Martinich C, Summers TA, Shang ES, Pruetz J D, McCoy AM, Mazel MK, Bolin CA. Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection *Infect Immun* 1998; 66: 1579-1587.
 49. Cullen PA, Cordwell S, Bulach DM, Haake DA, Adler B. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect Immun* 2002; 70: 2311-2318.
 50. Cullen PA, Haake D, Adler B. Outer membrane proteins of pathogenic *spirochetes*. *FEMS Microbiol Rev* 2004; 28: 291-318.

51. Adler B, De la Peña-moctezuma A. *Leptospira*. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Blackwell Editors 2004.
52. Trueba G, Zapata S, Madrid K, Cullen P Haake D. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. Int Microbiol 2004; 7: 35–40.
53. Doern G V. Detection of selected fastidious bacteria. Clin Infect Dis 2000; 30: 166-173.
54. Johnson RC, Wilson JB. Nutrition of *Leptospira pomona*. J Bacteriol 1960; 80: 406-411.
55. Stalheim OH, Wilson JB. Cultivation of *Leptospira* I Nutrition of *Leptospira Canicola*. J Bacteriol 1964; 88: 48-54.
56. Stalheim OH, Wilson JB. Cultivation of *Leptospirae* in Growth and Lysis in Synthetic Medium. J Bacteriol 1964; 88: 55-59.
57. Ellinghausen HC, Mc Collough WG. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes fractionation of oleic albumin complex and polysorbate 80. Am J Vet Res 1965;26: 45-57.
58. Prescott JF. Leptospirosis. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. Pathology of domestic animals. San Diego: Academic Press, 1993.
59. Pumarola A, Rodríguez-Torres A, García-Rodríguez JA, Piédrola-Angulo G. Microbiología y Parasitología Médica. 2ª ed: Salvat, 1994.
60. Ginebra G A. Microorganismos Espirales. En: Llop H A, Valdés-Dapena V M, Zuazo SJ. Microbiología y Parasitología Médicas. Tomo I, Ciudad de La Habana: Ciencia Médica, 2001.
61. Bolin CA, Alt DP. Use of monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. AM J Vet Res 2001; 62:995-1000.
62. Hanson LE. Immunology of bacterial diseases with special reference to leptospirosis. JAVMA 1977; 170: 991-994.
63. Leonard FC, Quinn PJ, Ellis WA, O'Farrell K. Association between cessation of leptospiruria in cattle and urinary antibody levels. Res Vet Sci 1993; 55: 195-202.
64. Heath SE, Johnson R. Leptospirosis. JAVMA 1994; 205: 1518-1523.
65. Michna S W. Leptospirosis. Vet Rec 1970; 86: 484-496.
66. Leonard FC, Quinn PJ, Ellis WA, O'Farrell K. Duration of urinary excretion of leptospirae by cattle naturally or experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. Vet Rec 1992; 131: 435-439.

67. Smith CR, Ketterer P J, McGowan M R, Corney B G. A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in cattle. Aust Vet J 1994; 71: 290-294.
68. Leonard FC, Quinn PJ, Ellis WA, O'Farrell K. Association between cessation of leptospiuria in cattle and urinary antibody levels. Res Vet Sci 1993; 55: 195-202.
69. Hathaway SC, Blackmore DK, Marshall RB. The serologic and cultural prevalence of *Leptospira interrogans* serovar balcanica in possums (*Trichosurus vulpecula*) in New Zealand. J Wildl Dis 1978; 14: 345-350.
70. Boqvist S, Thu HT, Vagsholm I, Magnusson U. The impact of *Leptospira* seropositivity on reproductive performance in sows in southern Viet Nam. Theriogenology 2002; 58: 1327-1335.
71. Trap D. Les petits mammifères sauvages, source de leptospirose. Rev Sci tech Off Int Epiz 1988; 7: 885-892.
72. Little TWA. Changes in our understanding of the epidemiology of leptospirosis. In: Ellis WA, Little TWA. Present state of leptospirosis diagnosis and control. Martinus Nijhoff Publishers, 1986.
73. Hathaway SC, Marshall RB, Little TW, Headlam SA, Winter PJ. Differentiation of reference strains of leptospires of the Pomona serogroup by cross-agglutination absorption and restriction endonuclease analysis. Res Vet Sci, 1985; 39: 145-150.
74. Thiermann AB. Leptospirosis: current developments and trends. J Am Vet Med Assoc 1984; 184: 722-725.
75. Hathaway SC, Little TW, Stevens AE. Serological and bacteriological survey of leptospiral infection in pigs in southern England. Res Vet Sci 1981; 31: 169-173.
76. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW .Veterinary Medicine. London 1999.
77. Alves U, Siqueira S, Pestana C. Patologia da Leptospirose Analise critica dos aspectos morfologicos e immuno-histoquimica relevantes para a comprensao da patogenia. Rev Inst Adolfo Lutz 1989; 49: 75-80.
78. Plank R, Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp in humans. Microbes Infect, 2000; 2: 1265-76
79. Organizacion Internacional de Epizootias. Manual of Diagnosis Test and Vacines for Terrestrial Animals 2004.
80. Smith CR, Ketler PJ, Mc Gowan MR, Corney BG. A review of laboratory techniques and their use in diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in cattle. Aust Vet J, 1994; 71: 290-294.

81. Myers D. Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis. Organización Panamericana de la Salud 1985.
82. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kurby J. Immunology. 5th ed. WH Freeman and Co 2003.
83. Tizard I. Inmunología Veterinaria. 6 ed, Interamericana 2001.
84. Parslow M, Stites D, Terr A, Imboden J. Inmunología Básica y Clínica. 10 ed. México: El manual moderno 2002.
85. Flannery B, Costa D, Carvalho FP, Guerreiro H, Matsunaga J, Da Silva ED, Ferreira A G, Riley LW, Reis MG, Haake DA, Ko AI, Flannery B, Costa D. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. J Clin Microbiol 2001; 39: 3303-3310.
86. Cespedes M, Glenny M, Felices V, Balda L, Suarez V. Prueba de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos IgM para el diagnóstico de leptospirosis humana. Rev Peru Med Exp Salud Pública 2003; 19: 24-27.
87. Everson D, Neto VA, Duarte MS. Diagnostico precoce da leptospirose por demonstracao de antigenos atravez de exame inmuno-histoquimico en musculo da panturrilha. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1992; 34: 375 – 381.
88. Herrmann JL, Baril C, Bellenger E, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Genome conservation in isolates of *Leptospira interrogans*. J Bacteriol 1991; 173: 7582-88.
89. Zuerner RL, Bolin CA. Repetitive sequence element cloned from *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjobovis provides a sensitive diagnostic probe for bovine leptospirosis. J Clin Microbiol 1988; 26: 2495-500.
90. Ahmed N, Devi SM, Valverde M de L, Vijayachari P, Machangu RS, Ellis WA, Hartskeerl RA. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2006. 23:28
91. Norma Oficial Mexicana NOM-029-SSA2-1999, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de la leptospirosis en el humano.
92. Diario Oficial, Primera Sección, 7 Jueves 20 de septiembre de 2007. Secretaria de Agricultura, Ganadería, desarrollo Rural, y Pesca. Pública. Acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos.
93. Norma Oficial Mexicana NOM-038-ZOO-1995, Requisitos mínimos para las bacterinas empleadas en la prevención y control de la leptospirosis bovina.

94. Ahmad SN, Shah S, Ahmad FM. Diagnosis del laboratorio del leptospirosis. J Postgrad Med 2005; 51: 195-200.
95. Cullen D, Haake D, Bulach D, Zuener R, Adler B. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. Inf Imm 2003; 71:2414-2421.
96. Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sanchez Y, Siqueira I, Bolin CA, Reis MG, Riley LW, Haake DA, Ko AI. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. Mol Microbiol 2003; 49: 929-945.
97. Rodríguez-Jiménez JA. Caracterización de una proteína de 60 kDa de *Leptospira interrogans* serovariedad Hardjo. (Tesis Maestría) México D.F: UNAM 2006.
98. Verdugo R, Calva E. Denaturing treatment of *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations for improved immunodiagnosis of typhoid fever. Asia P J Mol Bio Biotec 1993; 1:113-116.
99. Basurto F. Elaboración de un inmunógeno experimental contra la bordetelosis de los perros. (Tesis Doctoral) México DF: UNAM 2005
100. Atilano-López D, Campuzano-Ocampo VM, Ayanegui-Alcérreca MA, Jaramillo-Arango CJ, Martínez-Maya JJ, De la Peña-Moctezuma A. Estudio seroepidemiológico de leptospirosis en ganado bovino de cría al pastoreo en trópico en México. Memorias de la IV Reunión Científica y Taller Internacional "Leptospirosis Habana 2008" *Presentación de cartel.
101. Martínez-Gómez D. Desarrollo y estandarización de un inmunoensayo enzimático indirecto como método de diagnóstico para brucelosis caprina utilizando proteínas de la membrana externa de *Brucella melitensis*. (Tesis Licenciatura) México, DF: UNAM 1998.
102. Ternyinc T, Avrameas S. Técnicas inmunoenzimáticas. Grupo editorial Iberoamerica SA de CV 1989: 74-79.
103. Thursfield M. Veterinary Epidemiology. 3ª ed. London: Blackwell publishig, 2005:305-330.
104. Dohoo I, Martin W, Stryhnh H. Veterinary Epidemiologic Research. Canada: AVC inc 2003:85-120.
105. Findlay JW, Smith WC, Lee JW, Nordblom GD, Das I, DeSilva BS, Khan MN, Bowsher RR. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. J Pharm Biomed Anal 2000; 21:1249-1273.
106. Bordier C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. J Biol Chem 1981; 256: 1604-1607.

107. Barry R, Ganong G, John P, Delmore P. Phase Separation Temperatures of Mixtures of Triton X-114 and Triton X-45: Application to protein separation. *Annal Biochem* 1991; 193: 35-37.
108. Adler B, De la Peña-Moctezuma, A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 2009; en prensa.
109. Haake DA, Matsunaga J. Leptospiral membrane proteins - variations on a theme. *Indian J Med Res* 2005; 121:143-145.
110. Cullen PA, Xu X, Matsunaga J, Sanchez Y, Ko AI, Haake DA, Adler B. Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infect Immun* 2005: 4853–4863.
111. London E, Brown DA. Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Bioch Biophy Acta* 2000;1508:182-195.
112. González A, Batista N, Ortíz M, Torres V, Infante JF, González M. Evaluación de dos esquemas de inmunización para la producción de sueros hiperinmunes contra *Leptospira interrogans*. *Vacci Mon* 2002; 3: 6-10.
113. Adler B Cousins DV, Faine S, Robertson GM. Bovine IgM and IgG response to *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* as measured by Enzyme Immunoassay. *Vet Microbiol* 1982; 7: 577- 585.
114. Bercovich Z, Taaijke R, Bokhout BA. Evaluation of an ELISA for the diagnosis of experimentally induced and naturally occurring *Leptospira hardjo* infections in cattle. *Vet Microbiol* 1990; 21: 255-262.
115. Thiermann AB Garrett LA. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* and *pomona* in cattle. *Am J Vet Res* 1983;44: 884-887.
116. Mariya R Chaudhary P Kumar AA Thangapandian E Amutha R Srivastava SK. Evaluation of a recombinant LipL41 antigen of *Leptospira interrogans* serovar Canicola in ELISA for serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2006; 29:269-277.
117. Petrie A Watson P. *Statistics for Veterinary and Animal Science*. London: Blackwell 1999:168-181.
118. Yan KT Ellis WA, Mackieb DP Taylora MJ McDowellb SWJ Montgomery JM. Development of an ELISA to detect antibodies to a protective lipopolysaccharide fraction of *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo* in cattle 1999:*Vet Microbiol*;69:173-187.

APÉNDICE 1 SOLUCIONES Y REACTIVOS.

MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO DE CULTIVO EMJH PARA EL DESARROLLO DE LEPTOSPIRA

1. Preparación de soluciones stock; adicionar cada reactivo a cbp. 10 ml de agua destilada estéril (H₂Od.e.).

Reactivo	(solución Stock) En cbp. 10ml H ² Od.e.
Cloruro de Amonio (NH ₄ Cl)	2.5 g
Vitamina B 1(Tiamina)	.05 g
Piruvato de Sodio	1g
Glicerina	10ml
Cloruro de Calcio	1.5 g
Cloruro de Magnesio	1.5 g
Sulfato de Zinc	.4g
Sulfato de Cobre	.3g
Vitamina B12 (cianocobalamina)	.02g
Glicerol 20%	2ml
Sulfato Manganoso	.1g

2. Preparación del medio; Adicionar los siguientes reactivos a 900ml de H₂Od.e. en un matraz estéril, cuidando que la Albumina Sérica Bovina se disuelva por completo.

Reactivo	Cantidad
Fosfato Di sódico Anhidro	1g
Fosfato Mono potásico Anhidro	.3g
Cloruro de Sodio	1g
Albumina Sérica Bovina	10g
Cloruro de Amonio (NH ₄ Cl)	1ml (sol. stock)
Vitamina B 1(Tiamina)	1ml (sol. stock)
Piruvato de Sodio	1ml (sol. stock)
Glicerina	1ml (sol. stock)
Cloruro de Calcio	.7 ml (sol. stock)
Cloruro de Magnesio	.7 ml (sol. stock)
Sulfato de Zinc	1ml (sol. stock)
Sulfato de Cobre	.1ml (sol. stock)
Vitamina B12 (cianocobalamina)	.2ml (sol. stock)
Glicerol 20%	.5ml (sol. stock)
Sulfato Manganoso	1ml (sol. stock)
Piruvato de Sodio	.2g
Acetato de Sodio Anhidro	.1g

3. En otro matraz estéril disolver los siguientes reactivos en 50ml de H₂O destilada esteril

Reactivo	Cantidad
Tween 80	12.50ml
Sulfato Ferroso	0.01g

4. Los 50 ml anteriores se adicionan a él matraz con 900 ml del paso 2, posteriormente el medio se afora a 1000 ml y se ajusta el pH a 7.4.
5. El medio es prefiltrado a través de un prefiltro (Millipore™) seguido de una membrana, no estériles.
6. Las membranas que se utilizan para el prefiltrado son de 0.65 μm, 0.45 μm y finalmente 0.22 μm (Millipore™).
7. Posteriormente se esteriliza filtrando nuevamente todo el medio a través de una membrana de 0.22 μm (Millipore™) estéril.

SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN DE PROTEINAS DE LA MEMBRANA EXTERNA

2X TNE-PI	
NaCl	300 mM
Inhibidores de Proteasas	0.5%
Tris/HCl pH 8.0	20 mM
EDTA	4 mM

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS)

Se elabora a base de dos soluciones:

Solución de sorenson y solución salina fisiológica (SSF)

SOLUCIÓN DE SORENSEN	
Fosfato de sodio anhidro A Na₂ HPO₄	8.33g
Fosfato de potasio monobásico B KH₂PO₄	1.09g
Agua destilada	1000ml

Solución salina fisiológica	
Cloruro de Sodio Na Cl	8.5 g
Agua destilada	1000 ml

PBS	
Solución de Sorensen	40 ml
Solución salina fisiológica	460 ml

Al PBS se le ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza por autoclave.

PBS-5mM MgCl

Se prepara primeramente el PBS y por separado, se prepara la solución de cloruro de magnesio con una mayor molaridad a la requerida (50 mM, 500 mM o 1M), la solución concentrada de MgCl se esteriliza

A continuación se diluye la solución de MgCl de tal forma que se obtenga la concentración de 5 mM, utilizando como diluyente al PBS.

Amortiguador final de muestra (AFM)	
Tris hydrochloride pH6.8	62.5 mM
Glicerol	10%
SDS	2%

AFM-0.25 mM fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF)

Se prepara primeramente el AFM. Por separado, se prepara la solución de PMSF con una mayor molaridad a la requerida (2.5 mM, 25 mM o 250 mM), en 1000 ml de agua destilada estéril, lo cual equivale a una concentración 1M o 1000 mM.

Por las concentraciones a las que se usa este reactivo, es conveniente preparar volúmenes pequeños (5 o 10 ml).

La solución concentrada de PMSF se esteriliza mediante filtración (membranas de 0.45µm estériles).

A continuación se diluye la solución de PMSF de tal forma que se obtenga la concentración de 0.25 mM, utilizando como diluyente al AFM.

SOLUCIÓN DE TRITÓN X-114 AL 10%

Tritón X-114 grado proteína	10 ml
Agua destilada estéril	90 ml

Almacenar a 4°C en frasco ámbar.

SOLUCIONES PARA ELISA

SOLUCIÓN SALINA AMORTIGUADORA DE FOSFATOS 10 mM pH7.2	
Bifosfato ácido de sodio NaH₂PO₄	0.23 g
Fosfato alcalino de sodio Na₂HPO₄	1.15 g
NaCl	9.0 g
H₂O d.e.	1000 ml

Esterilizar por autoclave y guardar en refrigeración hasta su uso.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE CITRATOS 0.05 M, pH 4.0

Se elabora a base de dos soluciones: A y B

Solucion A	
Ácido Cítrico monohidratado	11.48 g
H₂O bidestilada	500 ml

Solución B	
Citrato sódico tribásico dihidratado	14.7 g
H₂O bidestilada	500 ml

Mezclar 330 ml de Sol. A con 235 ml de Sol. B y aforar a 1000 ml de H₂O bidestilada. Conservar en refrigeración.

SSAF-Tween (10mM pH 7.2, 0.05% de Tween 20).

Para preparar SSAF-Tween se agregan 0.5 ml por cada litro

SOLUCIÓN DE CROMÓGENO	
Ácido 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic (ABTS)	1.5 mg
Solución de Citrato	10 ml

SOLUCION DE SUSTRATO	
H₂O₂	5 µl
H₂O d.e	120 µl

SOLUCIONES PARA LA PREPARACIÓN DE SDS-PAGE

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	
Agua destilada	150 ml
Tris Base	54.45 g

Ajustar pH a 8.8 con HCl 1M, aforar a 300 ml y almacenar a 4°C

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	
Agua destilada	50 ml
Tris base	6.0 g

Ajustar el pH a 6.8 con HCl 1M, aforar a 100ml y almacenar a 4°C

SDS al 10.0%

Disolver 10 g de SDS en 50 ml de agua destilada, agitar y aforar a 100 ml

Persulfato de amonio (NH₄)₂S₂O₈

Disolver 0.05 g de Persulfato de amonio en 0.5 ml de agua bidestilada estéril.

Se prepara y se utiliza en el momento

AMORTIGUADOR DE MUESTRA	
0.5 M Tris HCl, pH 6.8	1.0 ml
Glicerol	0.8 ml
SDS 10.0%	1.6 ml
2 Mercaptoethanol	0.4 ml
azul de bromofenol	0.02 g
Agua destilada	3.8 ml

Diluir la muestra en proporción 1:1 con el amortiguador de muestra.

Calentar a 100 °C durante 5 min antes de colocar en el pozo del gel

Preferentemente almacenar a 4 °C en un recipiente ámbar

AMORTIGUADOR PARA ELECTROFORESIS 5X	
Tris base	15.0 g
Glicina	72 g
SDS	5.0 g
Agua destilada	1000 ml

Almacenar a 4°C. Solución de trabajo: diluir 200 ml en 1 lt de agua para corrida.

PREPARACIÓN DEL GEL SEPARADOR	
Agua destilada	3.35 ml
Acrilamida 30.0%	4.0 ml
1.5 M Tris HCl, pH 8.8	2.5 ml
SDS 10.0%	100µl
Persulfato de amonio 10%	50µl
TEMEDA	5µl

La mezcla para el gel se prepara agregando los componentes antes mencionados, excepto el persulfato de amonio y el TEMED. Se homogenizan perfectamente los componentes y previo al vaciado de la mezcla en la cámara de electroforesis, se agregan los dos catalizadores (persulfato de amonio y el TEMED), se homogeniza esta nueva mezcla rápidamente por agitación y se vierte al interior de dos cristales, ensamblados en un aditamento de la cámara.

PREPARACIÓN DEL GEL CONCENTRADOR AL 4%	
Agua destilada	3.05 ml
Acrilamida 30.0%	0.67 ml
0.5 M Tris HCl, ph 6.8	1.25 ml
SDS 10.0%	50µl
Persulfato de amonio 10%	25µl
TEMED	5 µl

Ya polimerizado el gel separador se prepara esta mezcla.

Se prepara agregando los componentes antes mencionados, excepto el persulfato de amonio y el TEMED. Se homogenizan perfectamente los componentes y previo al vaciado de la mezcla en la cámara de electroforesis, se agregan los dos catalizadores (persulfato de amonio y el TEMED), se homogeniza esta nueva mezcla rápidamente por agitación y se vierte al interior de dos cristales, ensamblados en un aditamento de la cámara.

SOLUCIÓN TEÑIDORA DE AZUL DE COOMASIE	
Etanol absoluto	500ml
Ácido acético	100ml
Agua destilada	500 ml
Azul de Coomasie	0.55 g

Se mezclan los componentes y se almacena en un frasco ámbar en un lugar fresco.

SOLUCIÓN DESTEÑIDORA PARA LA TINCIÓN DE AZUL DE COOMASIE	
Etanol absoluto	640 ml
Ácido acético	160 ml
Agua destilada	960 ml

Se mezclan los componentes y se almacena en un frasco ámbar en un lugar fresco.

APÉNDICE 2 BASE DE DATOS.

RESULTADOS PRIMER ENSAYO

CUADRO A.1

Lectura a 15 minutos de membranas nativas (N) y desnaturalizadas (D)												
Suero control (diluciones)	POSITIVO		NEGATIVO		POSITIVO		NEGATIVO		POSITIVO		NEGATIVO	
	ANTIGENO											
	N	D	N	D	N	D	N	D	N	D	N	D
	1 µg	1 µg	1 µg	1 µg	2 µg	2 µg	2 µg	2 µg	3 µg	3 µg	3 µg	3 µg
1/50	0.459	0.588	0.739	0.682	0.767	0.786	0.869	0.759	1.061	0.741	0.554	0.451
1/150	0.271	0.346	0.478	0.521	0.519	0.524	0.507	0.535	0.554	0.488	0.471	0.515
1/450	0.273	0.334	0.449	0.459	0.532	0.54	0.524	0.533	0.543	0.443	0.486	0.555
1/1350	0.258	0.312	0.439	0.41	0.53	0.532	0.534	0.576	0.528	0.434	0.526	0.558
1/4050	0.3	0.36	0.392	0.469	0.489	0.519	0.483	0.525	0.881	0.467	0.504	0.55

CUADRO A.2

Lectura a 25 minutos de membranas nativas (N) y desnaturalizadas (D)												
Suero control (diluciones)	POSITIVO		NEGATIVO		POSITIVO		NEGATIVO		POSITIVO		NEGATIVO	
	ANTIGENO											
	N	D	N	D	N	D	N	D	N	D	N	D
	1 µg	1 µg	1 µg	1 µg	2 µg	2 µg	2 µg	2 µg	3 µg	3 µg	3 µg	3 µg
1/50	0.533	0.663	0.783	0.761	0.796	0.813	0.675	0.759	0.803	0.776	0.62	0.772
1/150	0.312	0.387	0.493	0.961	0.52	0.522	0.486	0.532	0.546	0.517	0.487	0.522
1/450	0.308	0.375	0.49	0.487	0.531	0.536	0.536	0.531	0.537	0.47	0.497	0.54
1/1350	0.293	0.358	0.493	0.452	0.535	0.532	0.541	0.574	0.531	0.473	0.527	0.54
1/4050	0.338	0.407	0.528	0.495	0.495	0.522	0.507	0.525	0.528	0.496	0.516	0.538

CUADRO A.3

Lectura a 35 minutos de membranas nativas (N) y desnaturalizadas (D)												
Suero control (diluciones)	POSITIVO		NEGATIVO		POSITIVO		NEGATIVO		POSITIVO		NEGATIVO	
	ANTIGENO											
	N	D	N	D	N	D	N	D	N	D	N	D
	1 µg	1 µg	1 µg	1 µg	2 µg	2 µg	2 µg	2 µg	3 µg	3 µg	3 µg	3 µg
1/50	0.57	0.703	0.79	0.815	0.801	0.815	0.706	0.78	0.805	0.791	0.65	0.791
1/150	0.345	0.415	0.495	0.527	0.515	0.517	0.5	0.53	0.542	0.519	0.492	0.52
1/450	0.332	0.399	0.495	0.498	0.525	0.531	0.539	0.527	0.534	0.487	0.499	0.529
1/1350	0.319	0.386	0.483	0.471	0.533	0.529	0.543	0.57	0.526	0.487	0.523	0.53
1/4050	0.359	0.53	0.508	0.505	0.5	0.522	0.516	0.524	0.526	0.507	0.517	0.532

CUADRO A.4

Lectura a 15 minutos de membranas nativas (N) y desnaturalizadas (D)								
Suero control (diluciones)	POSITIVO		NEGATIVO		POSITIVO		NEGATIVO	
	ANTIGENO							
	N	D	N	D	N	D	N	D
	4 µg	4 µg	4 µg	4 µg	5 µg	5 µg	5 µg	5 µg
1/50	0.525	0.492	0.493	0.452	0.527	0.527	0.513	0.498
1/150	0.48	0.454	0.423	-0.159	0.567	0.537	0.536	0.556
1/450	0.472	0.455	0.462	0.368	0.518	0.535	0.545	0.538
1/1350	0.416	0.427	0.141	0.434	0.546	0.529	0.559	0.567
1/4050	0.431	0.349	0.181	0.439	0.536	0.533	0.543	0.533

CUADRO A.5

Lectura a 25 minutos de membranas nativas (N) y desnaturalizadas (D)								
Suero control (diluciones)	POSITIVO		NEGATIVO		POSITIVO		NEGATIVO	
	ANTIGENO							
	N	D	N	D	N	D	N	D
	4 µg	4 µg	4 µg	4 µg	5 µg	5 µg	5 µg	5 µg
1/50	0.527	0.51	0.509	0.491	0.523	0.531	0.52	0.51
1/150	0.498	0.484	0.456	0.451	0.567	0.542	0.541	0.566
1/450	0.491	0.484	0.487	0.402	0.524	0.543	0.543	0.532
1/1350	0.447	0.452	0.471	0.454	0.551	0.527	0.559	0.565
1/4050	0.461	0.382	0.477	0.498	0.533	0.532	0.539	0.526

CUADRO A.6

Lectura a 35 minutos de membranas nativas (N) y desnaturalizadas (D)								
Suero control (diluciones)	POSITIVO		NEGATIVO		POSITIVO		NEGATIVO	
	ANTIGENO							
	N	D	N	D	N	D	N	D
	4 µg	4 µg	4 µg	4 µg	5 µg	5 µg	5 µg	5 µg
1/50	0.526	0.525	0.517	0.495	0.519	0.532	0.521	0.524
1/150	0.503	0.499	0.476	0.471	0.561	0.542	0.54	0.568
1/450	0.502	0.501	0.498	0.426	0.521	0.541	0.54	0.533
1/1350	0.466	0.471	0.483	0.463	0.545	0.523	0.552	0.565
1/4050	0.479	0.406	0.495	0.481	0.528	0.531	0.535	0.535

CUADRO A.7

Lectura 15 min. Leptospiras totales, suero control positivo (pos) y negativo (neg).										
Suero control (diluciones)	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG
	ANTIGENO									
	*2x10 ⁶		*4x10 ⁶		*6x10 ⁶		*8x10 ⁶		*1x10 ⁷	
	4 µg	4 µg	4 µg	4 µg	4 µg	4 µg	4 µg	4 µg	4 µg	4 µg
1/50	0.492	0.38	0.504	0.467	0.649	0.548	0.552	0.559	0.549	0.427
1/150	0.459	0.345	0.477	0.39	0.533	0.535	0.548	0.57	0.558	0.375
1/450	0.453	0.322	0.447	0.336	0.55	0.558	0.591	0.567	0.588	0.469
1/1350	0.181	0.27	0.442	0.432	0.598	0.543	0.571	0.583	0.643	0.388
1/4050	0.473	0.398	0.471	0.587	0.534	0.521	0.543	0.551	0.565	0.397

* Leptospiras/ml

CUADRO A.8

Lectura 25 min. Leptospiras totales, suero control positivo (pos) y negativo (neg).										
Suero control (diluciones)	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG
	ANTIGENO									
	*2x10 ⁶		*4x10 ⁶		*6x10 ⁶		*8x10 ⁶		*1x10 ⁷	
	4 µg	4 µg	4 µg	4 µg	4 µg	4 µg	4 µg	4 µg	4 µg	4 µg
1/50	0.52	0.428	0.517	0.506	0.651	0.545	0.552	0.584	0.543	0.471
1/150	0.494	0.405	0.505	0.456	0.534	0.542	0.548	0.569	0.55	0.429
1/450	0.518	0.38	0.499	0.398	0.546	0.553	0.578	0.56	0.577	0.497
1/1350	0.492	0.321	0.484	0.498	0.606	0.54	0.561	0.579	0.636	0.437
1/4050	0.507	0.447	0.51	0.434	0.536	0.516	0.538	0.546	0.557	0.516

* Leptospiras/ml

CUADRO A.9

Lectura 35 min. Leptospiras totales, suero control positivo (pos) y negativo (neg).										
Suero control (diluciones)	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG
	ANTIGENO									
	*2x10⁶		*4x10⁶		*6x10⁶		*8x10⁶		*1x10⁷	
1/50	0.52	0.451	0.515	0.514	0.645	0.54	0.547	0.567	0.539	0.489
1/150	0.499	0.434	0.505	0.485	0.532	0.539	0.543	0.562	0.544	0.456
1/450	0.509	0.409	0.511	0.428	0.541	0.551	0.57	0.554	0.569	0.506
1/1350	0.503	0.352	0.496	0.532	0.602	0.533	0.557	0.572	0.628	0.462
1/4050	0.517	0.472	0.519	0.462	0.532	0.514	0.535	0.543	0.554	0.474

Leptospiras/ml

RESULTADOS SEGUNDO ENSAYO

CUADRO A.10

Leptospiras totales *2x10⁶ sueroshiperinmunes de conejo positivo								
Lecturas (minutos)	Diluciones de suero							
	50	150	450	1350	4050	12150	36450	109350
15 min	0.554	0.512	0.521	0.532	0.533	0.54	0.545	0.552
	0.56	0.57	0.567	0.551	0.55	0.552	0.547	0.55
	0.544	0.517	0.526	0.517	0.53	0.558	0.567	0.568
prom	0.553	0.533	0.538	0.533	0.538	0.550	0.553	0.557
25 min	0.552	0.51	0.522	0.53	0.535	0.546	0.551	0.551
	0.559	0.57	0.569	0.554	0.552	0.554	0.555	0.561
	0.528	0.516	0.524	0.521	0.53	0.558	0.565	0.565
prom	0.546	0.532	0.538	0.535	0.539	0.553	0.557	0.559

***Leptospiras/ml**

CUADRO A.11

Leptospiras totales *2x10⁶ sueroshiperinmunes de conejo negativo								
Lecturas (minutos)	Diluciones de suero							
	50	150	450	1350	4050	12150	36450	109350
15 min	0.497	0.487	0.458	0.426	0.436	0.407	0.407	0.402
	0.493	0.486	0.475	0.447	0.424	0.443	0.443	0.461
	0.543	0.551	0.54	0.525	0.501	0.489	0.489	0.499
prom	0.511	0.508	0.491	0.466	0.454	0.446	0.446	0.454
25 min	0.512	0.501	0.476	0.45	0.453	0.459	0.433	0.425
	0.507	0.501	0.493	0.471	0.525	0.452	0.469	0.51
	0.546	0.552	0.54	0.531	0.541	0.514	0.501	0.515
prom	0.522	0.518	0.503	0.484	0.506	0.475	0.468	0.483

***Leptospiras/ml**

CUADRO A.12

Leptospiras totales *4x10 ⁶ sueroshiperinmunes de conejo positivo								
Lecturas (minutos)	Diluciones de suero							
	50	150	450	1350	4050	12150	36450	109350
15 min	0.515	0.501	0.502	0.505	0.497	0.497	0.514	0.521
	0.5	0.529	0.513	0.512	0.5	0.517	0.514	0.532
	0.519	0.512	0.514	0.523	0.536	0.535	0.546	0.514
prom	0.511	0.514	0.510	0.513	0.511	0.516	0.525	0.522
25 min	0.515	0.515	0.508	0.513	0.509	0.509	0.52	0.524
	0.498	0.537	0.511	0.513	0.5	0.519	0.517	0.537
	0.52	0.524	0.529	0.527	0.536	0.535	0.548	0.528
prom	0.511	0.525	0.516	0.518	0.515	0.521	0.528	0.530

*Leptospiras/ml

CUADRO A.13

Leptospiras totales *4x10 ⁶ sueroshiperinmunes de conejo negativo								
Lecturas (minutos)	Diluciones de suero							
	50	150	450	1350	4050	12150	36450	109350
15 min	0.505	0.466	0.467	0.437	0.433	0.381	0.363	0.393
	0.475	0.478	0.46	0.404	0.446	0.449	0.47	0.497
	0.528	0.502	0.502	0.467	0.484	0.469	0.469	0.505
prom	0.503	0.482	0.476	0.436	0.454	0.433	0.434	0.465
25 min	0.522	0.487	0.492	0.462	0.457	0.411	0.388	0.414
	0.494	0.496	0.486	0.425	0.471	0.467	0.486	0.507
	0.534	0.522	0.526	0.499	0.507	0.497	0.488	0.537
prom	0.517	0.502	0.501	0.462	0.478	0.458	0.454	0.486

*Leptospiras/ml

CUADRO A.14

Leptospiras totales *6x10 ⁶ sueroshiperinmunes de conejo positivo								
Lecturas (minutos)	Diluciones de suero							
	50	150	450	1350	4050	12150	36450	109350
15 min	0.54	0.511	0.519	0.532	0.521	0.525	0.538	0.556
	0.508	0.498	0.507	0.512	0.531	0.53	0.527	0.541
	0.56	0.511	0.515	0.547	0.528	0.539	0.548	0.539
prom	0.536	0.507	0.514	0.530	0.527	0.531	0.538	0.545
25 min	0.529	0.51	0.516	0.516	0.52	0.527	0.538	0.554
	0.5	0.506	0.507	0.51	0.532	0.522	0.525	0.539
	0.509	0.517	0.52	0.519	0.524	0.536	0.542	0.53
prom	0.513	0.511	0.514	0.515	0.525	0.528	0.535	0.541

*Leptospiras/ml

CUADRO A.15

Leptospiras totales *6x10 ⁶ sueroshiperinmunes de conejo negativo								
Lecturas (minutos)	Diluciones de suero							
	50	150	450	1350	4050	12150	36450	109350
15 min	0.532	0.496	0.445	0.491	0.46	0.463	0.467	0.48
	0.519	0.501	0.48	0.387	0.448	0.393	0.466	0.511
	0.542	0.508	0.483	0.538	0.426	0.425	0.485	0.507
prom	0.531	0.502	0.469	0.472	0.445	0.427	0.473	0.499
25 min	0.524	0.512	0.493	0.5	0.494	0.492	0.496	0.505
	0.519	0.507	0.491	0.411	0.465	0.419	0.488	0.52
	0.542	0.52	0.503	0.545	0.462	0.455	0.502	0.519
prom	0.528	0.513	0.496	0.485	0.474	0.455	0.495	0.515

*Leptospiras/ml

PROMEDIOS LECTURAS LEPTOSPIRAS TOTALES

CUADRO A.16

Concentración	Sueros	Lecturas (minutos)	Diluciones de suero							
			50	150	450	1350	4050	12150	36450	109350
*2x10 ⁶	Positivos	15	0.553	0.533	0.538	0.533	0.538	0.550	0.553	0.557
		25	0.546	0.532	0.538	0.535	0.539	0.553	0.557	0.559
	Negativos	15	0.511	0.508	0.491	0.466	0.454	0.446	0.446	0.454
		25	0.522	0.518	0.503	0.484	0.506	0.475	0.468	0.483
*4x10 ⁶	Positivos	15	0.511	0.514	0.510	0.513	0.511	0.516	0.525	0.522
		25	0.511	0.525	0.516	0.518	0.515	0.521	0.528	0.530
	Negativos	15	0.503	0.482	0.476	0.436	0.454	0.433	0.434	0.465
		25	0.517	0.502	0.501	0.462	0.478	0.458	0.454	0.486
*4x10 ⁸	Positivos	15	0.536	0.507	0.514	0.530	0.527	0.531	0.538	0.545
		25	0.513	0.511	0.514	0.515	0.525	0.528	0.535	0.541
	Negativos	15	0.531	0.502	0.469	0.472	0.445	0.427	0.473	
		25	0.528	0.513	0.496	0.485	0.474	0.455	0.495	0.515

*Leptospiras/ml

MEMBRANAS NATIVAS

CUADRO A.17

Membrana externa nativas 1µg sueros hiperinmunes de conejo positivo								
Lecturas (minutos)	Diluciones de suero							
	50	150	450	1350	4050	12150	36450	109350
15 min	0.52	0.515	0.52	0.526	0.527	0.532	0.54	0.531
	0.523	0.54	0.549	0.519	0.525	0.514	0.48	0.573
	0.515	0.518	0.514	0.517	0.51	0.533	0.531	0.52
prom	0.519	0.524	0.528	0.521	0.521	0.526	0.517	0.541
25 min	0.529	0.519	0.523	0.524	0.523	0.527	0.537	0.537
	0.549	0.582	0.565	0.554	0.567	0.542	0.536	0.581
	0.515	0.523	0.517	0.525	0.518	0.531	0.529	0.52
prom	0.531	0.541	0.535	0.534	0.536	0.533	0.534	0.546
35 min	0.528	0.518	0.521	0.523	0.521	0.528	0.535	0.535
	0.548	0.568	0.563	0.56	0.573	0.548	0.554	0.58
	0.514	0.523	0.516	0.526	0.518	0.53	0.528	0.519
prom	0.530	0.536	0.533	0.536	0.537	0.535	0.539	0.545

CUADRO A.18

Membrana externa nativas 1µg sueros hiperinmunes de conejo negativo								
Lecturas (minutos)	Diluciones de suero							
	50	150	450	1350	4050	12150	36450	109350
15 min	0.514	0.521	0.523	0.531	0.529	0.535	0.561	0.538
	0.522	0.525	0.52	0.512	0.526	0.537	0.497	0.496
	0.521	0.522	0.528	0.509	0.434	0.454	0.525	0.522
prom	0.519	0.523	0.524	0.517	0.496	0.509	0.528	0.519
25 min	0.526	0.529	0.544	0.533	0.542	0.533	0.561	0.54
	0.53	0.527	0.526	0.52	0.532	0.534	0.531	0.524
	0.546	0.546	0.545	0.534	0.484	0.503	0.543	0.542
prom	0.534	0.534	0.538	0.529	0.519	0.523	0.545	0.535
35 min	0.528	0.528	0.548	0.532	0.543	0.531	0.566	0.538
	0.525	0.524	0.525	0.519	0.531	0.531	0.536	0.527
	0.546	0.548	0.546	0.541	0.509	0.522	0.541	0.543
prom	0.533	0.533	0.540	0.531	0.528	0.528	0.548	0.536

CUADRO A.19

Membrana externa nativas 2µg sueros hiperinmunes de conejo positivo								
Lecturas (minutos)	Diluciones de suero							
	50	150	450	1350	4050	12150	36450	109350
15 min	0.532	0.537	0.517	0.533	0.495	0.509	0.501	0.533
	0.507	0.525	0.523	0.523	0.525	0.517	0.522	0.543
	0.521	0.523	0.524	0.521	0.531	0.536	0.542	0.533
prom	0.520	0.528	0.521	0.526	0.517	0.521	0.522	0.536
25 min	0.528	0.531	0.524	0.538	0.51	0.524	0.518	0.535
	0.509	0.522	0.519	0.52	0.522	0.518	0.519	0.548
	0.517	0.523	0.521	0.521	0.532	0.535	0.545	0.53
prom	0.518	0.525	0.521	0.526	0.521	0.526	0.527	0.538
35 min	0.527	0.534	0.522	0.538	0.514	0.527	0.521	0.534
	0.505	0.521	0.518	0.514	0.526	0.516	0.517	0.545
	0.52	0.52	0.518	0.519	0.53	0.534	0.538	0.528
prom	0.517	0.525	0.519	0.524	0.523	0.526	0.525	0.536

CUADRO A.20

Membrana externa nativas 2µg sueros hiperinmunes de conejo negativo								
Lecturas (minutos)	Diluciones de suero							
	50	150	450	1350	4050	12150	36450	109350
15 min	0.517	0.521	0.522	0.535	0.535	0.549	0.539	0.548
	0.516	0.523	0.515	0.523	0.53	0.544	0.534	0.525
	0.552	0.553	0.552	0.553	0.548	0.555	0.543	0.563
prom	0.528	0.532	0.530	0.537	0.538	0.549	0.539	0.545
25 min	0.526	0.526	0.524	0.533	0.538	0.544	0.536	0.546
	0.517	0.524	0.522	0.52	0.532	0.537	0.537	0.524
	0.551	0.55	0.548	0.55	0.549	0.551	0.54	0.558
prom	0.531	0.533	0.531	0.534	0.540	0.544	0.538	0.543
35 min	0.539	0.526	0.523	0.529	0.539	0.539	0.532	0.541
	0.522	0.522	0.519	0.519	0.53	0.535	0.535	0.523
	0.554	0.548	0.545	0.546	0.546	0.547	0.537	0.552
prom	0.538	0.532	0.529	0.531	0.538	0.540	0.535	0.539

CUADRO A.21

Membrana externa nativas 3µg sueros hiperinmunes de conejo positivo								
Lecturas (minutos)	Diluciones de suero							
	50	150	450	1350	4050	12150	36450	109350
15 min	0.523	0.517	0.52	0.522	0.521	0.517	0.524	0.477
	0.504	0.509	0.513	0.506	0.525	0.514	0.529	0.515
	0.516	0.517	0.518	0.515	0.514	0.531	0.525	0.514
prom	0.514	0.514	0.517	0.514	0.520	0.521	0.526	0.502
25 min								
	0.52	0.509	0.518	0.521	0.521	0.519	0.523	0.505
	0.49	0.516	0.511	0.506	0.526	0.511	0.532	0.526
prom	0.515	0.519	0.519	0.517	0.518	0.534	0.531	0.519
35 min	0.508	0.515	0.516	0.515	0.522	0.521	0.529	0.517
	0.515	0.505	0.515	0.517	0.517	0.515	0.519	0.513
prom	0.485	0.514	0.507	0.503	0.52	0.506	0.525	0.523
	0.51	0.514	0.513	0.512	0.516	0.525	0.526	0.515
	0.503	0.511	0.512	0.511	0.518	0.515	0.523	0.517

CUADRO A.22

Membrana externa nativas 3µg sueros hiperinmunes de conejo negativo								
Lecturas (minutos)	Diluciones de suero							
	50	150	450	1350	4050	12150	36450	109350
15 min	0.558	0.532	0.569	0.541	0.518	0.528	0.562	0.528
	0.555	0.524	0.533	0.512	0.536	0.523	0.575	0.522
	0.554	0.562	0.555	0.551	0.549	0.564	0.54	0.538
prom	0.556	0.539	0.552	0.535	0.534	0.538	0.559	0.529
25 min	0.552	0.53	0.567	0.543	0.521	0.527	0.567	0.525
	0.577	0.524	0.53	0.515	0.537	0.522	0.572	0.519
	0.533	0.559	0.552	0.547	0.547	0.545	0.535	0.542
prom	0.554	0.538	0.550	0.535	0.535	0.531	0.558	0.529
35 min	0.546	0.526	0.562	0.538	0.518	0.525	0.564	0.52
	0.582	0.52	0.522	0.511	0.533	0.525	0.567	0.515
	0.545	0.555	0.548	0.543	0.544	0.547	0.532	0.54
prom	0.558	0.534	0.544	0.531	0.532	0.532	0.554	0.525

RESULTADOS TERCER ENSAYO

CUADRO A.23

Leptospiras totales *2x10 ⁶ sueros hiperinmunes de conejo positivo								
Lecturas (minutos)	Diluciones de suero							
	50	150	450	1350	4050	12150	36450	109350
15 min	0.531	0.522	0.526	0.527	0.529	0.525	0.535	0.539
	0.5	0.505	0.505	0.509	0.501	0.496	0.511	0.505
	0.513	0.508	0.511	0.506	0.507	0.46	0.529	0.426
prom	0.515	0.512	0.514	0.514	0.512	0.494	0.525	0.490
25 min	0.54	0.533	0.538	0.539	0.534	0.534	0.541	0.541
	0.51	0.519	0.514	0.521	0.513	0.505	0.525	0.526
	0.522	0.522	0.522	0.524	0.515	0.499	0.543	0.427
prom	0.524	0.525	0.525	0.528	0.521	0.513	0.536	0.498
35 min	0.537	0.533	0.535	0.537	0.529	0.53	0.54	0.538
	0.507	0.517	0.511	0.518	0.512	0.503	0.52	0.525
	0.52	0.523	0.521	0.524	0.514	0.519	0.539	0.495
prom	0.521	0.524	0.522	0.526	0.518	0.517	0.533	0.519

*Leptospiras /ml

CUADRO A.24

Leptospiras totales totales *2x10 ⁶ sueros hiperinmunes de conejo negativo								
Lecturas (minutos)	Diluciones de suero							
	50	150	450	1350	4050	12150	36450	109350
15 min	0.289	0.251	0.344	0.188	0.156	0.167	0.157	0.166
	0.332	0.259	0.349	0.194	0.17	0.157	0.17	0.178
	0.367	0.293	0.35	0.229	0.178	0.193	0.187	0.187
prom	0.329	0.268	0.348	0.204	0.168	0.172	0.171	0.177
25 min	0.338	0.298	0.401	0.224	0.187	0.198	0.183	0.189
	0.386	0.308	0.403	0.231	0.203	0.191	0.198	0.207
	0.422	0.341	0.417	0.268	0.258	0.226	0.201	0.205
prom	0.382	0.316	0.407	0.241	0.216	0.205	0.194	0.200
35 min	0.378	0.34	0.443	0.258	0.216	0.226	0.209	0.217
	0.427	0.348	0.439	0.265	0.231	0.213	0.228	0.238
	0.464	0.382	0.458	0.302	0.292	0.252	0.227	0.229
prom	0.423	0.357	0.447	0.275	0.246	0.230	0.221	0.228

Leptospiras /ml

CUADRO A.25

Leptospiras totales *4x10 ⁶ sueros hiperinmunes de conejo positivo								
Lecturas (minutos)	Diluciones de suero							
	50	150	450	1350	4050	12150	36450	109350
15 min	0.521	0.492	0.483	0.476	0.466	0.438	0.406	0.264
	0.489	0.49	0.491	0.49	0.504	0.432	0.405	0.288
	0.578	0.51	0.497	0.537	0.463	0.455	0.429	0.287
prom	0.529	0.497	0.490	0.501	0.478	0.442	0.413	0.280
25 min	0.525	0.491	0.506	0.486	0.493	0.466	0.445	0.311
	0.501	0.505	0.509	0.511	0.53	0.465	0.449	0.335
	0.59	0.527	0.521	0.561	0.499	0.5	0.48	0.339
prom	0.539	0.508	0.512	0.519	0.507	0.477	0.458	0.328
35 min	0.521	0.488	0.505	0.484	0.498	0.474	0.465	0.352
	0.498	0.502	0.507	0.512	0.535	0.476	0.474	0.378
	0.588	0.525	0.52	0.562	0.511	0.521	0.513	0.384
prom	0.536	0.505	0.511	0.519	0.515	0.490	0.484	0.371

Leptospiras /ml

CUADRO A.26

Leptospiras totales *4x10 ⁶ sueros hiperinmunes de conejo negativo								
Lecturas (minutos)	Diluciones de suero							
	50	150	450	1350	4050	12150	36450	109350
15 min	0.385	0.333	0.39	0.233	0.189	0.17	0.181	0.154
	0.359	0.31	0.392	0.232	0.188	0.185	0.168	0.158
	0.386	0.33	0.408	0.273	0.218	0.199	0.183	0.224
prom	0.377	0.324	0.397	0.246	0.198	0.185	0.177	0.179
25 min	0.441	0.388	0.441	0.275	0.224	0.199	0.214	0.177
	0.412	0.36	0.441	0.271	0.221	0.214	0.197	0.185
	0.441	0.386	0.461	0.317	0.255	0.233	0.21	0.255
prom	0.431	0.378	0.448	0.288	0.233	0.215	0.207	0.206
35 min	0.477	0.432	0.473	0.317	0.259	0.228	0.247	0.208
	0.453	0.403	0.475	0.31	0.258	0.248	0.228	0.21
	0.485	0.434	0.497	0.36	0.295	0.269	0.235	0.286
prom	0.472	0.423	0.482	0.329	0.271	0.248	0.237	0.235

Leptospiras /ml

MEDIA DEL TERCER ENSAYO

CUADRO A.27

Media aritmética									
Concentración	control	50	150	450	1350	4050	12150	36450	109350
*2x10 ⁶	positivo	0.520	0.520	0.520	0.523	0.517	0.508	0.531	0.502
	negativo	0.378	0.313	0.400	0.240	0.210	0.203	0.196	0.202
*4x10 ⁶	positivo	0.535	0.503	0.504	0.513	0.500	0.470	0.452	0.326
	negativo	0.427	0.375	0.442	0.288	0.234	0.216	0.207	0.206

*Leptospiras /ml

RESULTADOS CUARTO ENSAYO

CUADRO A.28

LEPTOSPIRAS TOTALES (CONCENTRACION)	DILUCIONES DE CONTROLES DE SUERO DE CONEJO									
	POSITIVO					NEGATIVO				
	50	150	450	1350	4050	50	150	450	1350	4050
* 2x10 ⁶	0.516	0.503	0.47	0.461	0.428	0.36	0.322	0.285	0.299	0.284
	0.503	0.509	0.48	0.442	0.344	0.32	0.284	0.257	0.281	0.284
	0.526	0.521	0.49	0.508	0.453	0.326	0.332	0.316	0.308	0.314
MEDIA	0.515	0.511	0.480	0.470	0.408	0.335	0.313	0.286	0.296	0.294
*4x10 ⁶	0.506	0.488	0.488	0.485	0.48	0.345	0.332	0.29	0.371	0.433
	0.527	0.506	0.5	0.481	0.45	0.3	0.295	0.31	0.334	0.324
	0.506	0.522	0.517	0.527	0.461	0.278	0.39	0.482		0.31
MEDIA	0.513	0.505	0.502	0.498	0.464	0.308	0.339	0.361	0.353	0.356

*Leptospiras /ml

RESULTADOS ESTABLECIMIENTO DE PUNTO DE CORTE ENSAYO PILOTO.

CUADRO A.29

Especie	Control	Dilución del suero 1/100								
		RÉPLICAS								
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
		Lectura 15 min			Lectura 25 min			Lectura 35 min		
Conejo	Positivo	0.482	0.334	0.509	0.499	0.362	0.509	0.51	0.389	0.534
		0.47	0.406	0.493	0.496	0.445	0.493	0.508	0.469	0.507
	Negativo	0.18	0.438	0.213	0.203	0.475	0.213	0.225	0.504	0.234
		0.292	0.318	0.218	0.328	0.358	0.218	0.36	0.388	0.24
Bovino	Positivo	0.343	0.43	0.393	0.382	0.468	0.393	0.415	0.491	0.425
		0.336	0.287	0.364	0.368	0.325	0.364	0.402	0.355	0.397
	Negativo	0.165	0.278	0.138	0.187	0.311	0.138	0.212	0.338	0.148
		0.234	0.267	0.198	0.252	0.304	0.352	0.276	0.335	0.381

CUADRO A.30

MEDIA ENTRE RÉPLICAS				
SUERO CONTROL	Media total	Lectura 1	Lectura 2	lectura 3
Conejo Positivo	0.468	0.449	0.467	0.486
Conejo Negativo	0.300	0.277	0.299	0.325
Bovino Positivo	0.385	0.359	0.383	0.414
Bovino Negativo	0.251	0.213	0.257	0.282

CUADRO A.31

DESVIACION ESTANDAR				
SUERO CONTROL	Total	Lectura 1	Lectura 2	lectura 3
Conejo Positivo	0.057	0.067	0.056	0.052
Conejo Negativo	0.101	0.095	0.108	0.112
Bovino Positivo	0.050	0.049	0.047	0.045
Bovino Negativo	0.077	0.056	0.082	0.088

RESULTADOS QUINTO ENSAYO PUNTO DE CORTE

CUADRO A.32

Suero control Positivo 1:100: nota réplicas del mismo suero en diferentes palcas y tiempo de lectura														
Lectura 1 (15 minutos)					Lectura 2 (25 minutos)				Lectura 3 (35 minutos)					
De densidad óptica														
Réplicas					Réplicas				Réplicas					
Placa					Placa				Placa					
1	2	3			1	2	3			1	2	3		
0.402	0.376	0.324			0.471	0.442	0.411			0.498	0.479	0.45		
0.438	0.395	0.333			0.467	0.432	0.417			0.496	0.463	0.451		
0.432	0.364	0.317			0.491	0.434	0.407			0.51	0.47	0.448		
0.39	0.396	0.319			0.455	0.452	0.408			0.487	0.483	0.449		
0.413	0.413	0.334			0.48	0.452	0.426			0.509	0.486	0.466		
0.4	0.344	0.337			0.498	0.415	0.42			0.53	0.456	0.458		
0.404	0.375	0.335			0.477	0.438	0.418			0.505	0.471	0.458		
0.435	0.412	0.381			0.495	0.473	0.458			0.524	0.5	0.493		
0.397	0.35	0.344			0.44	0.428	0.427			0.467	0.473	0.462		
0.403	0.365	0.333			0.444	0.44	0.421			0.471	0.483	0.462		
0.463	0.353	0.318			0.435	0.415	0.406			0.467	0.457	0.448		
0.446	0.479	0.313			0.433	0.457	0.4			0.466	0.48	0.443		
0.533	0.495	0.331			0.441	0.438	0.421			0.475	0.476	0.464		
0.553	0.489	0.325			0.46	0.436	0.416			0.491	0.475	0.458		
0.436	0.483	0.329			0.448	0.441	0.412			0.478	0.475	0.454		
0.444	0.393	0.372			0.468	0.458	0.453			0.498	0.491	0.49		
0.376	0.412	0.341			0.441	0.446	0.427			0.473	0.476	0.463		
0.399	0.376	0.309			0.433	0.426	0.396			0.466	0.464	0.44		
0.439	0.39	0.316			0.434	0.442	0.404			0.468	0.475	0.448		
0.358	0.409	0.316			0.432	0.443	0.401			0.468	0.47	0.444		
0.432	0.415	0.373			0.44	0.428	0.44			0.476	0.47	0.459		
0.476	0.463	0.322			0.444	0.446	0.408			0.474	0.481	0.449		
0.523	0.556	0.334			0.451	0.469	0.418			0.485	0.477	0.459		
0.484	0.407	0.369			0.484	0.469	0.453			0.513	0.499	0.489		
0.352	0.366	0.337			0.425	0.437	0.42			0.462	0.473	0.46		
0.346	0.416	0.332			0.453	0.416	0.422			0.488	0.456	0.464		
0.399	0.387	0.322			0.427	0.419	0.408			0.462	0.457	0.449		
0.358	0.365	0.306			0.449	0.411	0.395			0.485	0.454	0.44		
0.365	0.393	0.338			0.449	0.411	0.437			0.485	0.458	0.477		
0.367	0.463	0.344			0.44	0.424	0.427			0.474	0.465	0.465		
0.501	0.554	0.331			0.435	0.48	0.414			0.467	0.476	0.455		
0.464	0.41	0.37			0.478	0.46	0.439			0.507	0.492	0.478		
0.353	0.356	0.323			0.427	0.416	0.415			0.463	0.455	0.454		
0.347	0.472	0.336			0.424	0.404	0.425			0.462	0.446	0.466		
0.352	0.453	0.334			0.429	0.421	0.422			0.463	0.454	0.46		
0.347	0.508	0.323			0.43	0.413	0.414			0.468	0.45	0.456		
0.381	0.496	0.329			0.438	0.414	0.417			0.472	0.455	0.458		
0.411	0.498	0.318			0.432	0.429	0.406			0.464	0.458	0.448		
0.491	0.462	0.331			0.437	0.43	0.419			0.471	0.469	0.463		
0.426	0.399	0.381			0.475	0.451	0.459			0.502	0.485	0.492		
			total					total					total	
Md	0.418	0.423	0.335	0.392	0.450	0.436	0.420	0.436	0.482	0.471	0.460	0.471		
DS	0.055	0.057	0.019	0.062	0.021	0.019	0.016	0.022	0.019	0.013	0.014	0.018		
ES	0.009	0.009	0.003	0.006	0.003	0.003	0.003	0.002	0.003	0.002	0.002	0.001		
CV	13.1	13.4	5.8	15.8	4.7	4.3	3.8	5.1	3.9	2.9	3.0	3.8		

CUADRO A.33

Suero control Positivo 1:2500: nota réplicas del mismo suero en diferentes palcas y tiempo de lectura														
Lectura 1 (15 minutos)					Lectura 2 (25 minutos)				Lectura 3 (35 minutos)					
De densidad óptica														
Réplicas					Réplicas				Réplicas					
Placa					Placa				Placa					
1	2	3			1	2	3			1	2	3		
0.446	0.368	0.349			0.508	0.446	0.434			0.532	0.476	0.47		
0.438	0.362	0.356			0.491	0.444	0.442			0.513	0.478	0.48		
0.455	0.403	0.364			0.502	0.452	0.448			0.519	0.486	0.486		
0.439	0.471	0.372			0.496	0.462	0.456			0.517	0.496	0.493		
0.457	0.53	0.365			0.516	0.452	0.444			0.538	0.48	0.479		
0.488	0.516	0.45			0.519	0.449	0.436			0.536	0.476	0.47		
0.433	0.536	0.387			0.493	0.467	0.453			0.518	0.494	0.488		
0.491	0.449	0.419			0.535	0.487	0.483			0.546	0.515	0.509		
0.441	0.365	0.35			0.491	0.445	0.434			0.512	0.476	0.475		
0.432	0.358	0.434			0.493	0.44	0.512			0.515	0.477	0.547		
0.444	0.363	0.355			0.504	0.437	0.434			0.526	0.469	0.469		
0.441	0.378	0.367			0.503	0.454	0.446			0.528	0.487	0.482		
0.439	0.502	0.389			0.498	0.461	0.453			0.521	0.491	0.49		
0.431	0.52	0.405			0.487	0.455	0.448			0.51	0.481	0.484		
0.429	0.505	0.371			0.488	0.451	0.449			0.51	0.479	0.484		
0.435	0.437	0.404			0.493	0.489	0.475			0.515	0.514	0.503		
0.445	0.377	0.4			0.502	0.452	0.47			0.524	0.48	0.481		
0.433	0.344	0.374			0.497	0.423	0.449			0.523	0.462	0.483		
0.447	0.358	0.371			0.502	0.433	0.445			0.522	0.468	0.476		
0.444	0.368	0.424			0.497	0.442	0.49			0.515	0.477	0.515		
0.435	0.447	0.367			0.492	0.462	0.443			0.515	0.493	0.482		
0.431	0.447	0.379			0.494	0.44	0.449			0.516	0.469	0.482		
0.448	0.435	0.377			0.503	0.461	0.445			0.525	0.486	0.483		
0.427	0.428	0.4			0.487	0.488	0.469			0.511	0.512	0.501		
0.418					0.487					0.52				
0.427					0.493					0.524				
0.426					0.487					0.515				
0.429					0.498					0.526				
0.448					0.501					0.522				
0.422					0.485					0.517				
0.433					0.497					0.524				
0.432					0.489					0.512				
0.44					0.503					0.529				
0.445					0.508					0.533				
0.441					0.499					0.523				
0.439			total		0.501			total	0.524			total		
Md	0.440	0.428	0.385	0.421	0.498	0.454	0.454	0.473	0.522	0.484	0.488	0.501		
DS	0.015	0.064	0.027	0.045	0.010	0.017	0.019	0.027	0.008	0.014	0.017	0.022		
ES	0.002	0.013	0.006	0.005	0.002	0.003	0.003	0.002	0.001	0.002	0.003	0.002		
CV	3.389	15.03	7.083	10.6	2.0	3.7	4.3	5.6	1.6	2.9	3.5	4.4		

CUADRO A.34

Suero control Negativo: nota réplicas del mismo suero en diferentes placas y tiempo de lectura												
	Lectura 1 (15 minutos)				Lectura 2 (25 minutos)				Lectura 3 (35 minutos)			
	De densidad óptica											
	Réplicas				Réplicas				Réplicas			
	Placa				Placa				Placa			
	1	2	3		1	2	3		1	2	3	
	0.193	0.187	0.22		0.235	0.239	0.248		0.29	0.281	0.292	
	0.189	0.18	0.25		0.229	0.232	0.239		0.284	0.273	0.29	
	0.184	0.187	0.336		0.22	0.242	0.249		0.274	0.285	0.295	
	0.182	0.231	0.294		0.218	0.236	0.234		0.266	0.279	0.276	
	0.197	0.231	0.325		0.233	0.236	0.28		0.283	0.277	0.329	
	0.188	0.288	0.374		0.224	0.228	0.27		0.272	0.267	0.295	
	0.16	0.278	0.311		0.189	0.22	0.245		0.232	0.259	0.287	
	0.172	0.202	0.243		0.203	0.246	0.264		0.252	0.284	0.307	
	0.179	0.178	0.202		0.212	0.232	0.256		0.259	0.273	0.301	
	0.182	0.182	0.185		0.218	0.233	0.236		0.267	0.277	0.281	
	0.191	0.19	0.2		0.225	0.242	0.259		0.275	0.286	0.304	
	0.172	0.187	0.2		0.202	0.241	0.255		0.245	0.285	0.3	
	0.181	0.196	0.258		0.215	0.242	0.253		0.266	0.283	0.297	
	0.182	0.204	0.19		0.218	0.224	0.236		0.27	0.263	0.277	
	0.184	0.257	0.215		0.217	0.227	0.252		0.268	0.268	0.295	
	0.196	0.261	0.209		0.236	0.25	0.258		0.29	0.289	0.3	
	0.194	0.174	0.194		0.23	0.223	0.252		0.278	0.262	0.297	
	0.191	0.183	0.192		0.228	0.236	0.244		0.28	0.279	0.29	
	0.177	0.172	0.189		0.213	0.223	0.245		0.263	0.262	0.29	
	0.173	0.313	0.239		0.205	0.253	0.288		0.25	0.302	0.333	
	0.178	0.302	0.197		0.212	0.23	0.25		0.26	0.27	0.295	
	0.178	0.284	0.225		0.213	0.212	0.24		0.259	0.251	0.284	
	0.183	0.329	0.211		0.217	0.224	0.242		0.265	0.263	0.282	
	0.178	0.268	0.227		0.21	0.26	0.277		0.256	0.3	0.318	
	0.169				0.201				0.247			
	0.185				0.214				0.254			
	0.182				0.213				0.259			
	0.18				0.213				0.259			
	0.175				0.206				0.25			
	0.183				0.217				0.262			
	0.176				0.21				0.26			
	0.191				0.217				0.268			
	0.187				0.22				0.27			
	0.182				0.213				0.263			
	0.178				0.21				0.258			
	0.174			total	0.203			total	0.248			total
Md	0.182	0.228	0.237	0.211	0.216	0.235	0.253	0.232	0.264	0.276	0.296	0.277
DS	0.008	0.051	0.053	0.047	0.010	0.011	0.014	0.020	0.013	0.013	0.014	0.019
ES	0.001	0.010	0.011	0.005	0.002	0.002	0.003	0.002	0.002	0.003	0.003	0.002
CV	4.403	22.33	22.40	22.1	4.734	4.817	5.650	8.4	4.867	4.589	4.830	6.8

EVALUACION DE 100 SUEROS DE BOVINO

CUADRO A.35-A

Hato	Id. Animal	Hardjoprajitno AM	Lectura 15 min				Lectura 25 min				Lectura 35 min			
			Réplicas del suero dilución 1:100			media	Réplicas del suero dilución 1:100			media	Réplicas del suero dilución 1:100			media
			1	2	3		1	2	3		1	2	3	
4	03	50	0.194	0.258	0.188	0.213	0.215	0.264	0.206	0.228	0.237	0.289	0.226	0.251
4	06	50	0.294	0.294	0.288	0.292	0.381	0.331	0.317	0.343	0.362	0.358	0.346	0.355
6	5021	50	0.243	0.276	0.246	0.255	0.205	0.31	0.274	0.263	0.301	0.339	0.297	0.312
6	270	50	0.424	0.228	0.422	0.358	0.455	0.257	0.449	0.387	0.477	0.284	0.471	0.411
11	218	50	0.232	0.283	0.237	0.251	0.216	0.319	0.257	0.264	0.287	0.35	0.278	0.305
10	005	800	0.412	0.364	0.417	0.398	0.439	0.403	0.443	0.428	0.457	0.435	0.468	0.453
10	0047	800	0.398	0.386	0.378	0.387	0.432	0.432	0.398	0.421	0.436	0.46	0.429	0.442
5	36	0	0.313	0.411	0.303	0.342	0.35	0.452	0.335	0.379	0.38	0.483	0.366	0.410
5	463	0	0.306	0.424	0.282	0.337	0.343	0.468	0.309	0.373	0.375	0.494	0.342	0.404
10	4072	100	0.324	0.294	0.312	0.310	0.36	0.34	0.346	0.349	0.392	0.372	0.376	0.380
11	192	0	0.219	0.15	0.228	0.199	0.243	0.169	0.257	0.223	0.268	0.19	0.285	0.248
16	5	800	0.283	0.42	0.306	0.336	0.316	0.466	0.336	0.373	0.351	0.49	0.367	0.403
2	06		0.251	0.415	0.278	0.315	0.278	0.469	0.306	0.351	0.309	0.492	0.336	0.379
16	6	50	0.222	0.36	0.272	0.285	0.248	0.423	0.3	0.324	0.277	0.451	0.331	0.353
ex	6	0	0.287	0.232	0.289	0.269	0.318	0.293	0.321	0.311	0.351	0.32	0.351	0.341
ex	4	50	0.437	0.351	0.422	0.403	0.467	0.399	0.459	0.442	0.488	0.436	0.483	0.469
ex	7	1600	0.299	0.327	0.289	0.305	0.336	0.372	0.326	0.345	0.368	0.408	0.359	0.378
17	2	0	0.345	0.395	0.318	0.353	0.386	0.446	0.353	0.395	0.422	0.479	0.387	0.429
18	3	0	0.274	0.39	0.257	0.307	0.309	0.437	0.291	0.346	0.341	0.469	0.322	0.377
16	4	0	0.3	0.27	0.271	0.280	0.34	0.309	0.304	0.318	0.374	0.34	0.335	0.350
16	1	1600	0.304	0.4	0.256	0.320	0.34	0.445	0.281	0.355	0.373	0.479	0.311	0.388
12	7	50	0.287	0.158	0.259	0.235	0.319	0.176	0.288	0.261	0.35	0.198	0.322	0.290
3	09	50	0.264	0.347	0.284	0.298	0.297	0.408	0.315	0.340	0.326	0.442	0.345	0.371
14	4	0	0.299	0.429	0.272	0.333	0.327	0.476	0.307	0.370	0.362	0.534	0.342	0.413
9	656	25600	0.399	0.393	0.359	0.384	0.437	0.437	0.399	0.424	0.47	0.47	0.433	0.458
2	02	0	0.247	0.379	0.235	0.287	0.272	0.421	0.264	0.319	0.303	0.46	0.293	0.352
2	09	0	0.279	0.502	0.257	0.346	0.311	0.545	0.284	0.380	0.345	0.575	0.317	0.412
3	10	100	0.311	0.371	0.326	0.336	0.347	0.415	0.365	0.376	0.381	0.454	0.399	0.411
3	04	0	0.312	0.396	0.289	0.332	0.347	0.468	0.324	0.380	0.383	0.499	0.356	0.413
2	3	50	0.257	0.438	0.247	0.314	0.291	0.485	0.274	0.350	0.325	0.513	0.305	0.381
3	08	50	0.278	0.283	0.237	0.266	0.314	0.318	0.266	0.299	0.347	0.355	0.294	0.332
ex	10	100	0.232	0.386	0.21	0.276	0.262	0.436	0.237	0.312	0.29	0.474	0.264	0.343
18	1	0	0.301	0.326	0.273	0.300	0.337	0.367	0.298	0.334	0.37	0.411	0.334	0.372
16	14	200	0.3	0.413	0.324	0.346	0.336	0.462	0.359	0.386	0.375	0.491	0.386	0.417
9	442	200	0.348	0.377	0.333	0.353	0.387	0.43	0.37	0.396	0.419	0.462	0.403	0.428
4	04	0	0.288	0.408	0.246	0.314	0.32	0.451	0.273	0.348	0.352	0.481	0.304	0.379
3	01	100	0.257	0.403	0.248	0.303	0.289	0.454	0.28	0.341	0.321	0.488	0.308	0.372
3	05	100	0.287	0.278	0.254	0.273	0.322	0.315	0.28	0.306	0.354	0.349	0.302	0.335
18	5	50	0.238	0.331	0.232	0.267	0.263	0.393	0.261	0.306	0.289	0.429	0.285	0.334
2	7158	200	0.481	0.39	0.437	0.436	0.521	0.462	0.486	0.490	0.547	0.499	0.521	0.522
4	05	400	0.328	0.391	0.216	0.312	0.366	0.464	0.24	0.357	0.401	0.497	0.263	0.387
16	12	0	0.395	0.429	0.21	0.345	0.438	0.484	0.229	0.384	0.474	0.525	0.25	0.416
18	4	0	0.392	0.406	0.151	0.316	0.429	0.462	0.167	0.353	0.463	0.498	0.182	0.381
17	11	0	0.42	0.356	0.204	0.327	0.455	0.395	0.228	0.359	0.483	0.435	0.254	0.391
12	1	3200	0.425	0.372	0.41	0.402	0.461	0.414	0.451	0.442	0.491	0.444	0.479	0.471
17	7	6400	0.449	0.378	0.43	0.419	0.484	0.421	0.467	0.457	0.51	0.453	0.496	0.486
ex	9	400	0.465	0.3	0.425	0.397	0.497	0.341	0.465	0.434	0.516	0.375	0.493	0.461
ex	1	100	0.417	0.442	0.414	0.424	0.452	0.511	0.45	0.471	0.478	0.564	0.477	0.506
18	9	3200	0.37	0.27	0.318	0.319	0.406	0.309	0.339	0.351	0.437	0.363	0.353	0.384

CUADRO A.35-B

Hato	Id. Anim	Hardjoprajitno AM	Lectura 15 min				Lectura 25 min				Lectura 35 min			
			Réplicas del suero dilución 1:100			media	Réplicas del suero dilución 1:100			media	Réplicas del suero dilución 1:100			media
			1	2	3		1	2	3		1	2	3	
18	6	3200	0.269	0.255	0.239	0.254	0.297	0.312	0.266	0.292	0.323	0.35	0.294	0.322
ex	11	100	0.472	0.256	0.415	0.381	0.502	0.306	0.454	0.421	0.518	0.336	0.481	0.445
17	6	0	0.45	0.257	0.399	0.369	0.485	0.308	0.438	0.410	0.506	0.335	0.468	0.436
16	15	800	0.427	0.328	0.384	0.380	0.467	0.399	0.423	0.430	0.496	0.433	0.456	0.462
16	11	0	0.435	0.358	0.399	0.397	0.473	0.419	0.444	0.445	0.499	0.454	0.475	0.476
15	7	1600	0.328	0.236	0.321	0.295	0.367	0.256	0.361	0.328	0.395	0.297	0.399	0.364
15	4	3200	0.414	0.235	0.319	0.323	0.449	0.264	0.338	0.350	0.484	0.288	0.348	0.373
14	3	6400	0.257	0.268	0.269	0.265	0.287	0.296	0.301	0.295	0.317	0.325	0.33	0.324
13	12	6400	0.512	0.226	0.449	0.396	0.545	0.25	0.488	0.428	0.557	0.286	0.509	0.451
13	11	6400	0.438	0.302	0.431	0.390	0.476	0.339	0.468	0.428	0.504	0.386	0.493	0.461
13	8	1600	0.365	0.288	0.311	0.321	0.408	0.33	0.334	0.357	0.444	0.381	0.352	0.392
12	9	0	0.428	0.244	0.417	0.363	0.46	0.276	0.456	0.397	0.484	0.354	0.483	0.440
12	6	0	0.373	0.236	0.34	0.316	0.408	0.296	0.378	0.361	0.44	0.339	0.413	0.397
12	1	6400	0.416	0.362	0.396	0.391	0.448	0.404	0.435	0.429	0.477	0.448	0.466	0.464
5	31	1600	0.484	0.281	0.425	0.397	0.51	0.334	0.467	0.437	0.531	0.371	0.494	0.465
5	28	0	0.373	0.315	0.355	0.348	0.408	0.338	0.396	0.381	0.441	0.373	0.429	0.414
5	02	800	0.436	0.264	0.415	0.372	0.473	0.294	0.458	0.408	0.497	0.331	0.494	0.441
5	8217	200	0.42	0.282	0.183	0.295	0.448	0.312	0.186	0.315	0.479	0.342	0.182	0.334
10	4027	100	0.252	0.3	0.258	0.270	0.284	0.351	0.288	0.308	0.315	0.386	0.314	0.338
10	0019	400	0.449	0.258	0.407	0.371	0.48	0.307	0.445	0.411	0.507	0.337	0.47	0.438
10	1056	400	0.683	0.311	0.437	0.477	0.709	0.356	0.475	0.513	0.733	0.407	0.498	0.546
7	rob	0	0.367	0.319	0.319	0.335	0.406	0.346	0.343	0.365	0.44	0.399	0.349	0.396
9	657	102400	0.399	0.427	0.377	0.401	0.431	0.469	0.413	0.438	0.464	0.502	0.443	0.470
10	0057	800	0.249	0.317	0.238	0.268	0.277	0.352	0.268	0.299	0.307	0.388	0.3	0.332
14	7	25600	0.41	0.265	0.376	0.350	0.442	0.297	0.416	0.385	0.477	0.332	0.453	0.421
7	3	0	0.489	0.296	0.424	0.403	0.512	0.329	0.465	0.435	0.531	0.367	0.491	0.463
7	9	400	0.495	0.318	0.421	0.411	0.516	0.359	0.459	0.445	0.541	0.403	0.486	0.477
11	8	800	0.46	0.52	0.427	0.469	0.49	0.547	0.471	0.503	0.513	0.578	0.501	0.531
11	136	50	0.234	0.319	0.035	0.196	0.398	0.352	0.035	0.262	0.426	0.384	0.034	0.281
11	156	6400	0.359	0.33	0.464	0.384	0.527	0.373	0.502	0.467	0.548	0.413	0.525	0.495
4	13	800	0.49	0.32	0.456	0.422	0.491	0.356	0.494	0.447	0.517	0.391	0.518	0.475
4	12	800	0.456	0.417	0.452	0.442	0.507	0.457	0.49	0.485	0.53	0.499	0.513	0.514
4	9	0	0.468	0.434	0.433	0.445	0.584	0.474	0.467	0.508	0.495	0.507	0.493	0.498
3	1	100	0.504	0.256	0.303	0.354	0.344	0.284	0.332	0.320	0.375	0.314	0.365	0.351
3	3	400	0.312	0.432	0.272	0.339	0.309	0.476	0.304	0.363	0.338	0.51	0.339	0.396
3	15	100	0.328	0.28	0.295	0.301	0.363	0.307	0.326	0.332	0.397	0.335	0.361	0.364
6	1	50	0.392	0.342	0.33	0.355	0.423	0.381	0.366	0.390	0.457	0.421	0.401	0.426
6	3	50	0.297	0.244	0.245	0.262	0.325	0.266	0.271	0.287	0.354	0.297	0.298	0.316
6	5	400	0.364	0.534	0.354	0.417	0.399	0.554	0.394	0.449	0.426	0.58	0.431	0.479
8	15	100	0.368	0.322	0.354	0.348	0.403	0.356	0.391	0.383	0.427	0.381	0.415	0.408
8	10	800	0.462	0.44	0.476	0.459	0.494	0.466	0.507	0.489	0.516	0.487	0.526	0.510
8	6	200	0.294	0.294	0.305	0.298	0.327	0.329	0.337	0.331	0.351	0.353	0.361	0.355
5	15	100	0.43	0.392	0.444	0.422	0.463	0.422	0.471	0.452	0.486	0.447	0.495	0.476
5	8	0	0.559	0.552	0.583	0.565	0.639	0.642	0.663	0.648	0.695	0.696	0.716	0.702
1	14	50	0.591	0.579	0.631	0.600	0.669	0.656	0.711	0.679	0.728	0.711	0.767	0.735
1	3	3200	0.306	0.403	0.421	0.377	0.336	0.437	0.461	0.411	0.359	0.467	0.5	0.442
1	15	1600	0.462	0.45	0.477	0.463	0.492	0.478	0.502	0.491	0.511	0.5	0.523	0.511
6	9	200	0.453	0.468	0.444	0.455	0.485	0.502	0.478	0.488	0.498	0.522	0.498	0.506
6	14	200	0.436	0.424	0.462	0.441	0.467	0.455	0.492	0.471	0.491	0.48	0.517	0.496
8	2	400	0.324	0.308	0.323	0.318	0.36	0.342	0.348	0.350	0.376	0.369	0.387	0.377
8	15	100	0.375	0.36	0.37	0.368	0.416	0.409	0.407	0.411	0.444	0.43	0.43	0.435

APÉNDICE 3
DISCUSION DE
MEMBRANAS
EXTERNAS

El método con extractos de membranas resulto ser impráctico, incosteable y de baja confiabilidad, por lo cual, se decidió no continuar con la experimentación de este modelo. La especificidad del inmunoensayo radica en la detección de la reacción antígeno-anticuerpo, donde variaciones en la presentación estructural del antígeno tiene un impacto sobre la precisión y sensibilidad con que el anticuerpo puede reconocerle, reflejándose en la eficiencia del inmunoensayo como herramienta diagnóstica.¹⁰⁵

Los extractos de membrana a partir de cultivos de *Leptospira* fueron utilizados con el objetivo de conservar las lipoproteínas como antígeno principal, el método seleccionado de separación de fases lipídicas de membranas fue una modificación del protocolo propuesto por Matsunaga et al., 2003⁹⁶ a partir de tritón 114 el cual tiene diferentes aplicaciones para obtener extractos de membrana.

El método más utilizado para la extracción de membranas es la utilización de detergentes no iónicos como tritón 110 y 114, ya que tienen las ventajas de separar proteínas de membrana externa de las periplásmicas.⁹⁷ Los detergentes no iónicos se han utilizado frecuentemente para la solubilización y caracterización de proteínas de membrana. En el proceso de solubilización con el detergente no iónico, la mayor parte de las moléculas lípidas de membrana que están en contacto con el extremo hidrofóbico de la proteína de membrana es reemplazada por el detergente, como resultado se obtienen micelas proteína-detergente.¹⁰⁶ En la extracción de proteínas de membrana con tritón 114 se obtienen dos fases; una acuosa donde se retienen las proteínas hidrofílicas y una fase detergente donde se retienen las proteínas hidrofóbicas (Ej: lipoproteínas e integrinas de tipo lipídico)¹⁰⁷

London y Brown 2000¹¹¹ señalan que la concentración del detergente, la composición, cantidad y tipo de lípidos en la membrana determinan el que una proteína en particular lipoproteína sea solubilizada en forma completa en la fase detergente, o que se formen micelas detergente-lípido-proteína y no se logre un extracto limpio de las estructuras de interés. Lo anterior puede tener un impacto en las características físico-químicas de los posibles antígenos de captura a utilizarse en un inmunoensayo, punto importante en el caso particular de la obtención de antígenos de captura y en la conservación de sus epítomos.

Posteriormente al extracto de membranas en la presente investigación se utilizo el proceso de desnaturalización de proteínas descrito por Verdugo y Clava 1993:⁹⁷ este incluyó el uso de 2-Mercaptoethanol, SDS, una temperatura de 96°C durante 5 minutos con la finalidad de linearizar las proteínas. Procedimiento que seguramente tuvo un efecto físico y químico sobre la estructura de antigénica de las lipoproteínas de membrana resultando en la obtención de un antígeno de captura no adecuado para el reconocimiento por anticuerpos anti-*Leptospira* como se puede observar el as figuras 4.2,4.3 y 4.5.

En segundo término, se utilizaron los antígenos de membrana para la producción de sueros inmunes en un esquema paralelo al utilizado con los leptospiras muertas, en el cual se obtuvo un título final 1:100 para ambos conejos inmunizados con extractos de membrana, en tanto los animales inmunizados con leptospiras muertas obtuvieron títulos >1:200. Se produjo el correspondiente suero inmune en conejo para ser utilizado como testigo el cual demostró ser efectivo, mediante la inoculación vía subcutánea en la región dorsal del conejo los días 0, 4, 7, 21 y 28 de los extractos de membrana desnaturalizadas adicionadas con carbopol como adyuvante. Semejante a lo reportado por Basurto (2005)⁹⁹ en ratón de laboratorio y Rodríguez-Reyes (2007).⁴² Sin embargo, como ya se discutió anteriormente existen protocolos de inmunización con los cuales se obtiene un título más alto de anticuerpos. A pesar de esto fueron adecuados para permitir utilizarlos en el ensayo de estandarización con membranas externas.¹¹³

Se concluyó que de alguna manera se dañó o se afectó la estructura antigénica de los posibles antígenos de captura presentes en la membrana externa posiblemente alterando los epítomos, lo cual se reflejó en su pobre calidad como antígeno de captura y como inumógeno. La OIE (2004)⁸² en el capítulo de Principios de validación para las pruebas diagnósticas de enfermedades infecciosas, indica que los factores que pueden interferir en la precisión analítica de un inmunoensayo incluyen equipo de laboratorio, el error técnico, la elección de los reactivos (tanto desde el punto de vista químico como biológico), la calibración, ajuste y límites de validez de los controles, los recipientes de las reacciones, la calidad del agua, pH y la fuerza iónica de los tampones y diluyentes, temperaturas en el ensayo, así como los errores que se introducen por detección de compuestos estrechamente relacionados, del tipo de anticuerpos. Por lo que, se tomó la decisión de no continuar explorando el extracto de membrana como fuente de antígeno captura debido a que era evidente que para establecer las condiciones óptimas para la extracción y/o la pertinencia de utilizar el proceso de desnaturalización requería de protocolos múltiples y detallados que rebasaban el objetivo del presente trabajo.