



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CORRELACIÓN ENTRE LA CAPACIDAD DE *Leptospira* spp. PARA CAPTURAR
FACTOR H Y SU SOBREVIVENCIA AL SUERO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

AZAF MORENO TORRES

TUTOR PRINCIPAL:

ALFREDO SAHAGÚN RUIZ: FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA

COMITÉ TUTORAL:

INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER: FACULTAD DE MEDICINA

ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA: FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MÉXICO, CD.MX., OCTUBRE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 todos los que me ayudaron a salir adelante con su apoyo moral, su tiempo, sus palabras de aliento y consejos. Sin ustedes este trabajo nunca hubiera salido a la luz.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por seguir siendo mi apoyo profesional.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en diferentes departamentos: Posgrado: donde su personal me apoyó siempre en los trámites necesarios para continuar, Departamento de Microbiología e Inmunología, donde realicé el proceso experimental de la tesis y por el apoyo logístico de su personal, Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola, sección producción cunícola, donde me apoyaron para obtener suero de conejo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la Beca Nacional otorgada para la realización de este posgrado. CVU 594214.

Este proyecto fue financiado por PAPIIT-UNAM IN222214-3 “Interacción de Proteínas Activadoras y Reguladoras del Sistema del Complemento Con bacterias patógenas Gram-negativas de interés para salud animal y humana” Responsable: Dr. Alfredo Sahagún Ruiz

A los miembros de mi comité tutor: Dr. Alfredo Sahagún Ruiz, Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser y Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma, por su apoyo, tiempo, consejos y revisiones de esta tesis.

A los miembros del jurado: Dra. Beatriz Arellano Reynoso, Dra. Gabriela Bárcenas Morales, Dr. Jorge Isaac Torres Barranca y Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito, por su revisión y puntos de vista sobre el presente trabajo.

Al MVZ. Daniel Atilano López por proporcionar cepas de *Leptospira* utilizadas para los experimentos.

A la MVZ G. Hilda Jandete Díaz, MVZ MC Marisa del C. Vázquez García, MVZ. Liliana Castro Flores, MVZ Claudia Rangel Pastrana, MVZ Angélica González Tinoco y MVZ César Hugo Granados Rojas por su apoyo durante la obtención de suero de conejo y por sus enseñanzas.

Al Sr. Salomón Durán Flores por su apoyo con la configuración del microscopio de campo oscuro.

A la Lic. Jocelyn Dennis López Ayala por su apoyo en la toma de muestras de suero humano.

A la MVZ. Stephanie Itzel Vázquez Padilla, quien me brindó apoyo logístico durante las vacaciones y económico para culminar este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Ema, Héctor, César, Abraham, Irving y Luz Elena, por su apoyo durante la toma de muestras y realización de experimentos.

Resumen

Con la finalidad de conocer si la captura de Factor H del sistema de complemento por *Leptospira* correlaciona con su sobrevivencia al suero humano en cepas de bajo y alto pasaje; se determinó la capacidad de captura de Factor H por diferentes cepas de *Leptospira* spp., mediante ensayos de ELISA. El porcentaje de sobrevivencia al suero humano normal fue determinado por conteo directo en cámara de Petroff-Hausser considerando como 100% el desarrollo de *Leptospira* en suero humano inactivado. Se utilizaron trece cepas patógenas y una cepa saprófita de *Leptospira* spp. Tres de las cepas de *Leptospira* spp., patógenas fueron reactivadas por infección en hámster (virulentas) y sus tres correspondientes fueron atenuadas por siete pases en cultivo. Adicionalmente, se evaluaron diez cepas de alto pasaje empleadas en la técnica de aglutinación microscópica para diagnóstico de leptospirosis. Se encontró diferencia significativa en la capacidad de captura de Factor H entre las cepas de bajo y alto pasaje de *Leptospira* Canicola LOCaS46 y *L. Icterohaemorrhagiae* LOVe30, pero no en las de *L. Tarassovi* MOCA45. Adicionalmente, se observaron diferencias en la capacidad de captura entre las serovariedades probadas. Se observó una correlación positiva entre la capacidad de captura del Factor H por *Leptospira* spp y su sobrevivencia ante el suero humano normal.

Palabras clave: *Leptospira*, Factor H, captura, ELISA, sobrevivencia

Abstract

In order to know if the Factor H of the complement system capture by *Leptospira* spp. correlates with its survival to Human Normal Serum in strains with Low and High Passage, we determined the FH capture-capacity of different leptospiral strains using ELISA assays. The survival percentage was determined by direct counting in a Petroff-Hausser Chamber considering as 100% the leptospiral growing in human serum inactivated by heat. We used thirteen pathogenic strains and a saprophytic *Leptospira* spp. strain. Three of these pathogenic strains were reactivated by infecting Golden Syrian Hamsters (Virulent) and their three correspondent strains were attenuated by seven culture passages. Additionally, we assessed ten strains with very high passage used in the microagglutination test to diagnose leptospirosis. We found significant differences in the FH capture capacity between the High and Low Passage strains of *Leptospira interrogans* serovar Canicola strain LOCaS 46 and *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae strain LOVe30, but not in *Leptospira santarosai* serovar MOCA45. Additionally, we observed differences in the capture capacity of the other leptospira strains assayed. We assessed a positive correlation between the FH capture by *Leptospira* spp., and its survival to NHS.

Keywords: *Leptospira*, Factor H, capture, ELISA, survival

Contenido

Dedicatoria	I
Agradecimientos.....	II
Resumen	III
Abstract.....	IV
Contenido	V
Lista de Figuras	VIII
Lista de Cuadros	VIII
I. Introducción.....	1
II. Revisión de la literatura.....	2
El sistema de complemento.....	2
Vía clásica del complemento.....	2
Vía de las lectinas del complemento.....	3
Vía alterna del complemento.....	3
Complejo de ataque de membrana (Membrane Attack Complex, MAC)	4
Reguladores del sistema del complemento	4
Factor H	7
<i>Leptospira</i> y leptospirosis	7
Factores de virulencia	9
Lipopolisacárido.....	9
Proteínas estructurales de membrana externa	9
Flagelo	10
Hemolisinas y evasión de la respuesta inmune celular	11
Adhesinas.....	11
Evasión del sistema del complemento por <i>Leptospira</i>	11
Proteínas de <i>Leptospira</i> que capturan los reguladores de complemento.....	14
Justificación.....	15
Objetivos.....	15
General	15
Específicos	15
Hipótesis	16

III.	Material y Métodos.....	17
	Suero humano normal (SHN).....	17
	Cepas bacterianas	17
	Evaluación de la capacidad de captura del Factor H por <i>Leptospira</i> spp.	18
	Ensayo de sobrevivencia de <i>Leptospira</i> al suero humano normal.....	19
	Análisis estadístico.....	20
IV.	Resultados.....	21
	Captura de Factor H por serovariedades de <i>Leptospira</i> spp. de bajo y alto pasaje....	21
	Sobrevivencia al Suero Humano Normal con serovariedades de bajo y alto pasaje..	23
	Captura de Factor H por diez serovariedades de <i>Leptospira</i> spp. de alto pasaje	26
	Sobrevivencia de diez serovariedades de <i>Leptospira</i> spp., de alto pasaje al suero humano normal.....	28
	Correlación entre la captura de Factor H y la sobrevivencia de leptospiras de alto y bajo pasaje al suero humano normal	31
	Correlación entre la captura de Factor H y la sobrevivencia de leptospiras de alto pasaje al suero humano normal.....	33
V.	Discusión y conclusiones	35
	Discusión	35
	Conclusiones.....	38
VI.	Referencias	40
	Abreviaturas y siglas usadas.....	55
	Anexos	57
	Anexo 1.- Técnica de ELISA para determinación de captura de Factor H por parte de <i>Leptospira</i> spp. (Meri et al., 2005, Barbosa et al., 2009, Sahagún-Ruiz et al., 2014)	57
	Anexo 2.- Técnica para determinación de sobrevivencia al Suero Humano Normal por <i>Leptospira</i> spp. (Meri et al., 2005, Barbosa et al., 2009)	60
	Anexo 3.- Preparación de medio EMJH modificado (Barbosa et. al.,2009).....	61
	Anexo 4. Matriz de datos del experimento de Captura de Factor H de suero por <i>Leptospira</i> spp. de bajo y alto pasaje.....	62
	Anexo 5. Matriz de datos de sobrevivencia al suero humano normal con serovariedades de <i>Leptospira</i> spp. de bajo y alto pasaje.....	63

Anexo 6. Matriz de datos de Captura de Factor H por diez serovariedades de <i>Leptospira</i> spp. de alto pasaje.....	64
Anexo 7.- Matriz de datos del ensayo de sobrevivencia de diez serovariedades de <i>Leptospira</i> spp., de alto pasaje al suero humano normal.....	65
Anexo 8.- Porcentajes de captura de FH por OD 492 nm y de sobrevivencia a SHN y arcosenos de <i>Leptospira</i> spp. de alto y bajo pasaje.....	66
Anexo 9.- Porcentajes de captura de FH por OD 492 nm y de sobrevivencia a SHN y arcosenos de <i>Leptospira</i> spp. de bajo pasaje.....	67

Lista de Figuras

Figura 1.- Captura de Factor H de suero por <i>Leptospira</i> spp de bajo y alto pasaje.....	22
Figura 2.-Sobrevivencia de <i>Leptospira spp</i> de bajo y alto pasaje a suero humano normal.	24
Figura 3.- Porcentaje de sobrevivencia de <i>Leptospira</i> spp de bajo y alto pasaje a suero humano normal.....	25
Figura 4.- Captura de Factor H por diez serovariedades de <i>Leptospira</i> spp. de alto pasaje.	27
Figura 5.- Sobrevivencia de diez serovariedades de leptospiras de alto pasaje al suero humano normal.....	29
Figura 6.-Porcentaje de sobrevivencia de diez serovariedades de leptospiras de alto pasaje al suero humano normal.	30
Figura 7.- Correlación entre la captura de Factor H y la sobrevivencia de leptospiras de alto y bajo pasaje al suero humano normal.	32
Figura 8.- Correlación entre la captura de Factor H y la sobrevivencia de leptospiras de alto pasaje al suero humano normal.....	34

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Reguladores de complemento.....	6
Cuadro 2. Bacterias Gram negativas que capturan FH y C4BP.....	13
Cuadro 3.- Cepas utilizadas de <i>Leptospira</i> spp. de bajo y alto pasaje.....	17
Cuadro 4.- Cepas de <i>Leptospira</i> spp., utilizadas para realizar la prueba de Aglutinación Microscópica en el Depto. de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM	18

I. Introducción

El sistema del complemento es parte de la inmunidad innata, desempeña un papel central en la eliminación de patógenos, complejos inmunes, células dañadas; además participa como modulador de la respuesta inmune adaptativa (Medzhitov and Janeway Jr, 2000). Este sistema es extremadamente reactivo, por lo que, para evitar daños a las células del propio organismo y el consumo de sus componentes, requiere de una regulación fina. Entre los principales reguladores solubles se encuentran el Factor H que regula la vía alterna de complemento y la C4BP que regula las vías clásica y de las lectinas (Jozsi and Zipfel, 2008; Bajic *et al.*, 2015).

La leptospirosis es una enfermedad causada por espiroquetas Gram negativas del género *Leptospira* que afecta a mamíferos, incluido el humano. La enfermedad se caracteriza por provocar desde un cuadro autolimitante hasta uno severo con daños oculares, en pulmón, hígado y riñón. Constituye una zoonosis de importancia mundial transmitida por orina de animales infectados o portadores asintomáticos que a su vez contaminan cuerpos de agua, facilitando su transmisión a la población. (Bharti *et al.*, 2003; Vijayachari *et al.*, 2008; Adler and de la Peña Moctezuma 2010) *Leptospira* presenta diversos factores de virulencia, entre ellos están las adhesinas que capturan reguladores del complemento del huésped (Factor H y C4BP) para evadir la acción del complemento. Las adhesinas de *Leptospira* capaces de capturar Factor H son LenA y LenB (Stevenson *et al.*, 2007). Lsa30, Lsa25 y Lsa33 son capaces de ligar C4BP (Barbosa *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2012; Domingos *et al.*, 2012). Mientras que las adhesinas LigA, LigB, Lsa23 y LcpA son capaces de capturar tanto Factor H como C4BP (Castiblanco-Valencia *et al.*, 2012; Choy 2012; Siqueira *et al.*, 2013) Se ha establecido que las leptospiras patógenas son capaces de sobrevivir a la acción del complemento. El objetivo del presente trabajo fue determinar si la capacidad de captura de Factor H por *Leptospira* spp. correlaciona con su sobrevivencia al suero humano normal.

II. Revisión de la literatura

El sistema de complemento

La respuesta inmune a agentes infecciosos puede ser dividida en dos subsistemas interconectados: Inmunidad innata e inmunidad adaptativa. La inmunidad adaptativa está organizada principalmente en dos clases de linfocitos especializados, células T y B, que expresan receptores específicos ante los antígenos permitiendo su detección específica y la subsecuente eliminación de patógenos, la inmunidad adaptativa tiene la facultad de producir linfocitos de memoria específicos que son capaces de dar una respuesta más rápida y eficiente en caso de reinfección. La inmunidad innata, por su parte, incluye moléculas y células efectoras que proveen una respuesta inmune fuerte e inmediata y reconoce a los agentes infecciosos por medio de patrones moleculares asociados a patógenos [PAMPS] (Medzhitov and Janeway Jr, 2000); incluye moléculas que evolucionaron en organismos primitivos, que son muy importantes en la respuesta inmune contra patógenos como los receptores tipo Toll (Toll-Like-Receptos), las ficolinas, las lectinas de unión a manosa (Mannose Binding Lectin, MBL) y las pentraxinas (Dunkelberger y Song, 2010). El sistema del complemento es una parte esencial de la inmunidad innata, que desempeña un papel central en la eliminación de patógenos (Walport, 2001). También participa en la angiogénesis, movilización de células hematopoyéticas progenitoras y regeneración de tejidos (Mastellos y Lambris, 2002, Ricklin *et al.*, 2010). El Sistema de complemento está constituido por más de treinta proteínas séricas y de membrana que se encuentran en forma inactiva. El sistema puede ser activado por tres vías: la vía clásica, la vía de las lectinas y la vía alterna.

Vía clásica del complemento

Esta vía es dependiente de anticuerpos, ya que es iniciada cuando la molécula de C1q se une a los anticuerpos IgM o IgG unidos al antígeno. C1q se compone de 18 cadenas agrupadas en seis hélices triples tipo colágena, asociadas a dos serinproteasas C1r y a dos C1s (Kishore and Reid, 2000; Kindt *et. al.*, 2007).

Adicionalmente, C1q es capaz de activar al complemento directamente, mediante el reconocimiento de estructuras microbianas y células apoptóticas (Nauta *et al.*, 2002), o bien, a través de pentraxinas, como la proteína C reactiva (Jiang *et al.*, 1991).

C1r activa a C1s, que desdobra a C4 en C4a y C4b. C4b se deposita en la superficie bacteriana actuando como opsonina. Enseguida, C4b capta C2 y C1s desdobra C2 en C2a y C2b. C2a permanece unido a C4b y constituye la convertasa de C3 (C4b2a) (Walport, 2001, Ricklin *et al.*, 2010).

Vía de las lectinas del complemento

Esta vía se activa medio del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos, por la MBL, que es una colectina que reconoce manosa en la superficie de los microorganismos (Matsushita and Fujita, 1992, McMullen *et al.*, 2006). Otras moléculas activadoras de la vía de las lectinas son las ficolinas H, L y M, que contienen dominios similares a colágeno y fibrinógeno, que reconocen carbohidratos acetilados en la superficie de los patógenos llevando a la activación subsecuente de las serin proteasas asociadas a MBL (MASPs 1, 2, y 3) (Matsushita and Fujita, 1995; Matsushita *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2008. MASP2 activa C4 y C2, formando la convertasa de C3 similar a la vía clásica de complemento (C4b2a). Adicionalmente, MASP1 puede cortar directamente a C3 como ocurre en la vía alterna del complemento (Matsushita *et al.*, 2000, Walport, 2001, Endo *et al.*, 2006).

Vía alterna del complemento

Esta vía se activa mediante la hidrólisis espontánea del enlace tioéster de C3 (C3H₂O). El C3 hidrolizado se une al componente B, el cual es desdoblado por el Factor D en Ba y Bb produciendo una convertasa soluble de C3 (C3H₂O-Bb), la cual desdobra C3 en C3a y C3b (Pangburn and Müller-Eberhard, 1980). C3b se une a proteínas, lípidos y carbohidratos presentes en superficies de microorganismos y se

une al componente B, que es desdoblado por el Factor D formando la convertasa de C3 de la vía alterna (C3bBb), fijada a la superficie del patógeno (Walport, 2001, Harboe and Mollnes, 2008). La fracción C3a, tiene función anafilotóxica y quimiotáctica para leucocitos (Janssen and Gros, 2007). La molécula C3bBb es estabilizada por properdina y iones de magnesio. A la convertasa de C3 se une otro C3b produciendo C3bBb3b, que tiene actividad de convertasa de C5 (Fearon and Austen, 1975; Pangburn and Müller-Eberhard, 1984). La amplificación de la vía alterna del complemento incrementa la densidad de C3b depositado sobre la superficie del patógeno, favoreciendo su fagocitosis ya que C3b actúa como opsonina (Joiner *et al.*, 1984), además de conducir a la formación de las convertasas de C5 (C4b2a3b o C3bBb3b) (Ricklin *et al.*, 2010).

Complejo de ataque de membrana (Membrane Attack Complex, MAC)

El MAC es la fase terminal donde confluyen las tres vías del complemento. Las convertasas de C5 (C4b2a3b o C3bBb3b) desdoblan a C5 en C5a y C5b, esta última queda unida a la superficie del patógeno y permite la agregación de los componentes C6 y C7, el complejo se inserta en la membrana celular cuando se integra el componente C8, el cual permite la subsecuente polimerización de 12-18 unidades de C9 que forman un poro, de 90 a 110 Å de diámetro [C5b6-7-8-9(n)]. Estos poros son responsables de causar la destrucción del patógeno blanco (Müller-Eberhard, 1985; Zalman and Müller-Eberhard, 1990; Ricklin *et al.*, 2010; Hadders *et al.*, 2012).

Reguladores del sistema del complemento

El complemento puede dañar a las células del hospedero, aun si las células están sanas y no son reconocidas por la vía clásica o la vía de las lectinas, sin embargo, podrían ser blanco de C3b producido por la hidrólisis espontánea de C3 en la vía alterna, o bien por la activación de cualquiera de las vías en un lugar adyacente a las células sanas. (Bajic *et al.*, 2015). La regulación de la vía alterna se lleva a cabo

mediante proteínas reguladoras negativas solubles y fijas a la membrana celular. Varios reguladores actúan a nivel de las convertasas de C3 (C4b2a y C3bBb), se unen a C4b o C3b evitando la formación de las convertasas, facilitan el desensamble de las convertasas, y actúan como cofactores de la serinproteasa Factor I para la inactivación de C3b y C4b (Jozsi and Zipfel, 2008). La regulación se completa con el decaimiento espontáneo de las proteínas activadas y complejos enzimáticos debido a que poseen una vida media corta (Liszewski *et al.*, 1996). En el Cuadro 1 se muestran las proteínas reguladoras del complemento.

Cuadro 1. Reguladores de complemento

Regulador	Vía que regula	Ligando	Función
Reguladores solubles			
C1INH	Clásica y lectinas	C1r, C1s y MASP-2	Bloquea las serinproteasas C1r/s, MASPs, factores de coagulación y C3b.
Factor H (Existen FHL-1 y FHR-1 al 5)	Alternativa	C3b, C3d	Reconoce superficies propias, se une a C3b inhibiendo la formación de la convertasa de C3, desestabiliza la convertasa de C3/C5, actúa como cofactor para Factor I.
Properdina	Alternativa	C3	Estabiliza las convertasas de la vía alternativa
Carboxi-peptidasa-N	Clásica y lectinas	C3a, C4a y C5a	Inactiva las anafilotoxinas
C4BP	Clásica y lectinas	C4	Se une a C4b inhibiendo la formación de la convertasa de C3, desestabiliza la convertasa de C3/C5, actúa como cofactor para Factor I
Clusterina (Apolipoproteína J)	MAC	C7, C8, C9 y MAC	Transporte de colesterol, HDL, APOA4 y lípidos, bloquea C7-C9 y la fase de fluido del MAC
Vitronectina (Proteína S)	MAC	C5b-7 y MAC	Evita el ensamble del MAC
Reguladores presentes en membrana			
CR1 (CD35)	C3	C3b, iC3b, C4b y C1q	Limpieza de complejos inmunes, inducción de fagocitosis, acelerador de decaimiento de convertasas, cofactor para Factor I
DAF (CD55)	C3	C4b2b y C3Bb	Acelera el decaimiento de la convertasa de C3
MCP (CD46)	C3	C3b y C4b	Degradación de C3, cofactor para FH y FI, efector de maduración de linfocitos T
Protectina (CD59)	MAC	C8	Inhibe el ensamble y formación de MAC

Fuentes: Liszewski et al., 1996; Zipfel and Skerka, 2009; Ricklin et al., 2010; Bajic et al., 2015)

De los reguladores antes descritos, el Factor H es el más potente inhibidor de complemento, así como el más estudiado (Ferreira *et al.*, 2010; Bajic *et al.*, 2015). A continuación, se realiza una descripción más detallada de Factor H.

Factor H

El Factor H (FH) es una glicoproteína abundante en el suero que se produce constitutivamente en el hígado (Adinolfi *et al.*, 1981; Schwaeble *et al.*, 1987; Ferreira *et al.*, 2010), y puede ser expresada localmente por diferentes células como las células epiteliales de pigmento retinal, células endoteliales, plaquetas, células mesenquimales y túbulos seminíferos (Brooimans *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 2007, Licht *et al.*, 2009; Sakaue *et al.*, 2010; Tu *et al.*, 2010). Se reportan como valores promedio en el suero humano normal $442.7 \pm 105.8 \mu\text{g/ml}$ (Ripoche *et al.*, 1988; De Paula *et al.*, 2003), las variaciones son dependientes de factores genéticos y ambientales (Esparza-Gordillo *et al.*, 2004; de Cordoba y de Jorge, 2008).

La regulación de la vía alterna de complemento ocurre en plasma, el FH posee tres funciones: unirse a C3b, evitando la formación de la convertasa de C3, desplazar Bb de la convertasa de C3 y actuar como cofactor del Factor I, para la hidrólisis de C3b (Rodríguez de Cordoba *et al.*, 2004; Jozsi and Zipfel, 2008 Ferreira *et al.*, 2010). El FH se une a las células del hospedero y evita la progresión de la activación del complemento por la vía alterna, interactuando con el C3b depositado en las células adyacentes al sitio de activación (Joiner *et al.*, 1984; Pangburn and Müller-Eberhard, 1984; Pangburn, 1987; Pangburn *et al.*, 2009). Las estructuras que contienen alta cantidad de heparina sulfatada y glucosaminoglicanos (GAG) como heparán sulfato y dermatán sulfato, fijan más al FH regulando negativamente al complemento (Kazatchkine *et al.*, 1979; Carreno *et al.*, 1989).

Leptospira y leptospirosis

Leptospira es un género de espiroquetas Gram negativas que incluye especies saprófitas y patógenas de las que se conocen 300 serovariedades incluidas en 20 especies (Adler and Faine, 2006; Picardeau, 2013). *Leptospira* es visible por

microscopía de campo oscuro, observándose como organismos helicoidales, delgados y móviles, con un diámetro de 0.1 μm y una longitud de 6 a 20 μm con un enrollamiento en sentido hacia la derecha (Carleton *et al.*, 1979). Presentan dos ganchos uno en cada extremo, exhiben desplazamiento rápido en medio líquido, así como movimientos de flexión y rotacionales sobre su propio eje. En medios viscosos y en superficie celular mucosa, exhiben movilidad de tipo reptante. La estructura de su pared es similar a la de las bacterias Gram negativas, pero debido a su tamaño la tinción de Gram no es útil. Pueden ser observadas con tinciones argénticas, por medio de conjugados fluorescentes o por técnicas de inmunohistoquímica (Adler y Faine, 2006). Las especies patógenas del género *Leptospira*, son causantes de la leptospirosis (Forbes *et al.*, 2012).

La leptospirosis en mamíferos puede llegar a ser leve o grave, causando daño tisular en hígado, riñones, hemorragia pulmonar y muerte; así como abortos y mortinatos en perros, bovinos y cerdos (Prescott *et al.*, 1987; Scanziani *et al.*, 1992; Andre-Fontaine, 2006). En equinos causa uveítis recurrente (Verma *et al.*, 2013; Polle *et al.*, 2014). Los animales infectados con *Leptospira* que sobrevivieron al cuadro clínico persisten como portadores, mientras que las ratas y ratones actúan como portadores sanos y reservorios. La leptospirosis puede ser transmitida al hombre y es considerada una zoonosis de importancia mundial, constituyendo un riesgo a la salud pública (Bharti *et al.*, 2003; Vijayachari *et al.*, 2008). El humano se contagia cuando tiene contacto directo con orina de portadores de *Leptospira* (Sepúlveda *et al.*, 2002; Cediell y Villamil, 2004; Vado-Solís *et al.*, 2014), con agua de consumo, de uso recreativo, deportivo o laboral contaminadas con *Leptospira* (Natarajaseenivasan *et al.*, 2002; Díaz *et al.*, 2008; Desai *et al.*, 2009; Forbes *et al.*, 2012), así como agua contaminada en inundaciones por desastres naturales (Sanders *et al.*, 1999; Levett, 2004; Raghavan *et al.*, 2012). Las manifestaciones clínicas de leptospirosis en humanos van desde dolor de cabeza, fiebre, malestar general, mialgias, sufusión conjuntival, y salpullido transitorio; pudiendo ser de intensidad media y autolimitante, hasta la enfermedad de Weil, caracterizada por

fiebre, ictericia, daño renal, hepático y neurológico, vasculitis difusa, y choque séptico produciendo coagulación intravascular diseminada (Plank and Dean, 2000; (Abuauad *et al.*, 2005; Adler and De la Peña Moctezuma, 2010; y Maroun *et al.*, 2011). También se ha reportado síndrome hemorrágico pulmonar severo sin la semiología antes descrita (Marotto *et al.*, 1999; Gouveia *et al.*, 2008; Del Carlo Bernardi *et al.*, 2012).

Factores de virulencia

Lipopolisacárido

El Lipopolisacárido (LPS) de *Leptospira*, carece de 2-ceto-desoxiamino-octanato (KDO) presente en el LPS de otras bacterias Gram negativas (De souza y Koury, 1992); presenta menor actividad biológica (500 veces) comparado con el LPS de *Salmonella* Typhimurium, además de carecer de actividad pirogénica (Shimizu *et al.*, 1987; Vihn *et al.*, 1986,). En conjunto con el péptidoglicano (L-PG) y las glicoproteínas (GLP), induce la expresión de TNF- α e IL-10 en las células dendríticas utilizando TLR-2 y TLR-4, así como de IL-1, IL-6 e IL-8 causando daño tisular (Gaudart *et al.*, 2008; Cinco *et al.*, 1996; Diament *et al.*, 2002; Goris *et al.*, 2011)

Proteínas estructurales de membrana externa

LipL32 se encuentra en la sub-superficie de la membrana de las especies de *Leptospira* (Pinne and Haake, 2013). Se expresa en cultivo, así como durante la infección en mamíferos y se encuentra altamente conservada en especies patógenas, pero no se expresa en especies saprófitas (Haake *et al.*, 2000). Se conoce que LipL32 induce nefritis túbulointersticial a través de la inducción de la expresión de genes asociados a NF- κ B (Yang, 2002). LipL32 atrapa calcio para mantener la estabilidad y movilidad de *Leptospira*, se comporta como adhesina, y se ha utilizado en el diagnóstico de leptospirosis con la técnica de ELISA (Dey *et al.*, 2004; Hauk *et al.*, 2008; Hauk *et al.*, 2009).

LipL41 es una proteína expresada en la membrana externa de leptospiras patógenas (Shang et al., 1996, Barnett et al., 1999), es capaz de unir dos moléculas de hemina, vitales para promover el desarrollo bacteriano (Lin et al., 2013) y es activada por medio de la proteína chaperona denominada lep (King et al., 2013). LipL41 también se ha utilizado en el diagnóstico de leptospirosis por medio de la técnica de ELISA (Mariya et al., 2006), así como antígeno vacunal asociado con OmpL1 (Haake et al., 1999).

LigA y LigB (Leptospiral Ig-like) son proteínas presentes en leptospiras patógenas; son producidas en condiciones de alta osmolaridad) y existe regulación positiva durante la patogénesis. Poseen capacidades de adhesina y capturan reguladores de complemento (Matsunaga et al., 2003; Matsunaga et al., 2005; Choy et al., 2007; Pappas and Picardeau, 2015).

Loa22 forma un puente que conecta el cilindro protoplásmico, con el péptidoglicano y la membrana externa, tiene actividad de adhesina y forma parte de los mecanismos de invasión (Ristow *et al.*, 2007).

OmpL1 es una porina de *Leptospira* conservada en serovariedades patógenas que podría ser utilizada como antígeno vacunal (Dong *et al.*, 2008).

Flagelo

La movilidad de las leptospiras es dependiente de dos endoflagelos periplásmicos, que salen de cada extremo de *Leptospira*, localizados entre el cilindro protoplásmico y la membrana externa. Los endoflagelos le permiten moverse a través de medios gelatinosos como el tejido conectivo. (Li *et al.*, 2000, Picardeau *et al.*, 2001).

Hemolisinas y evasión de la respuesta inmune celular

Leptospira presenta hemolisinas con actividad de esfingomielinasas, estas son SphH, Sph1, 2, 3 y 4; son capaces de lisar los eritrocitos para obtener nutrientes tales como ácidos grasos de cadena larga y hierro; y de este modo favorecer el crecimiento de *Leptospira* (Segers *et al.*, 1992; Adler and de la Peña Moctezuma, 2010; Carvalho *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012,). Las hemolisinas también lisan linfocitos y macrófagos permitiendo evadir la respuesta inmune celular (Zhang *et al.*, 2007).

Adhesinas

Las moléculas de adhesión en *Leptospira* spp. se encuentran en su membrana e interactúan con fibronectina, laminina, colágeno y elastina (Vieira *et al.*, 2014).

LigB se adhiere a la matriz extracelular del epitelio renal, está involucrada en la nefritis túbulointersticial y falla renal; e interactúa con heparina en la adhesión a las células renales (Lin and Chang, 2007; Ching *et al.*, 2012)., La proteína de 36-kDa se adhiere a fibronectina (Merien *et al.*, 2000), LenA, LenB, LenC, LenD, LenE y LenF a laminina y fibronectina (Stevenson *et al.*, 2007), Lsa24 y Lsa25 a laminina (Barbosa *et al.*, 2006; Domingos *et al.*, 2012), Lsa21 a laminina, colágeno tipo IV y fibronectina plasmática (Atzingen *et al.*, 2008), LipL32 a colágeno tipo IV y fibronectina plasmática (Hauk *et al.*, 2008), Lp95 a laminina y fibronectina (Atzingen *et al.*, 2009), Lsa63 a laminina y colágeno tipo IV (Vieira *et al.*, 2010), Lsa23 a laminina, fibronectina y plasminógeno (Siqueira *et al.*, 2013), Lsa 25, Lsa26, Lsa36 y Lsa32 a laminina y plasminógeno (Domingos *et al.*, 2012; Siqueira *et al.*, 2013; Domingos *et al.*, 2015).

Evasión del sistema del complemento por *Leptospira*

El sistema del complemento constituye la primera línea de defensa del hospedero, desempeñando un papel crucial en el reconocimiento y eliminación de leptospiras. La activación de la vía alterna es uno de los mecanismos efectores más importantes durante las primeras horas de la infección por *Leptospira*. Las leptospiras saprófitas

como *L. biflexa* son eliminadas en pocos minutos en presencia de suero humano normal *in vitro*, mientras que las especies patógenas de *Leptospira* pueden resistir la acción del sistema del complemento (Fraga *et al.*, 2011). Se ha reportado la captura de los reguladores del complemento, como el Factor H y C4BP, por bacterias Gram negativas como se describe en el Cuadro 2

Cuadro 2. Bacterias Gram negativas que capturan FH y C4BP

Especies	FH	C4BP	Referencia
<i>Bordetella pertussis</i>	✓	✓	(Berggård <i>et al.</i> , 1997; Berggård <i>et al.</i> , 2001; Amdahl <i>et al.</i> , 2011)
<i>Borrelia bissetii</i> , <i>B. spielmanii</i> <i>B. parkeri</i> , <i>B. turicatae</i>	✓		(Schott <i>et al.</i> , 2010; Kisova-Vargova <i>et al.</i> , 2012)
<i>Borrelia burgdorferi</i> , <i>B. duttoni</i> , <i>B. hermsii</i> , <i>B. recurrentis</i>	✓	✓	(Colombo and Alugupalli, 2008; Hovis <i>et al.</i> , 2008; Kenedy <i>et al.</i> , 2009; Kisova-Vargova <i>et al.</i> , 2012; Fine <i>et al.</i> , 2014; Madar <i>et al.</i> , 2015)
<i>Borrelia afzelii</i> , <i>B. garinii</i>		✓	(Madar <i>et al.</i> , 2015)
<i>Escherichia coli</i> K1		✓	(Prasadarao <i>et al.</i> , 2002; Wooster <i>et al.</i> , 2006; Maruvada <i>et al.</i> , 2008)
<i>Escherichia coli</i> TG1	✓		(Tan <i>et al.</i> , 2011)
<i>Francisella tularensis</i> ssp. holartica	✓		(Kreizinger <i>et al.</i> , 2015)
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	✓		(Friberg <i>et al.</i> , 2008)
<i>Haemophilus influenzae</i>	✓	✓	(Hallstrom <i>et al.</i> , 2007; Fleury <i>et al.</i> , 2014; Langereis <i>et al.</i> , 2014),
<i>Histophilus somni</i>	✓		(Inzana <i>et al.</i> , 2012)
<i>Leptospira interrogans</i>	✓	✓	(Verma <i>et al.</i> , 2006; Barbosa <i>et al.</i> , 2009)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	✓	✓	(Nordstrom <i>et al.</i> , 2004; Bernhard <i>et al.</i> , 2014)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	✓	✓	(Ram <i>et al.</i> , 1998; Ram <i>et al.</i> , 2001; Blom <i>et al.</i> , 2001; Ngampasutadol <i>et al.</i> , 2005; Ngampasutadol <i>et al.</i> , 2008; Welsch y Ram, 2008; Agarwal <i>et al.</i> , 2010; Shaughnessy <i>et al.</i> , 2009; Shaughnessy <i>et al.</i> , 2011; Gulati <i>et al.</i> , 2012; Lewis <i>et al.</i> , 2013)
<i>Neisseria meningitidis</i>	✓	✓	(Shaughnessy <i>et al.</i> , 2009; Konar <i>et al.</i> , 2013; Lemee <i>et al.</i> , 2014)
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	✓	✓	(Sahagun-Ruiz <i>et al.</i> , 2014)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>		✓	(Potempa <i>et al.</i> , 2008)
<i>Prevotella intermedia</i>	✓	✓	(Malm <i>et al.</i> , 2012)
<i>Salmonella entérica</i> sv. Typhimurium	✓	✓	(Ho <i>et al.</i> , 2011; Ho <i>et al.</i> , 2010)
<i>Salmonella entérica</i> sv. Enteritidis		✓	(Ho <i>et al.</i> , 2011)
<i>Treponema denticola</i>	✓		(McDowell <i>et al.</i> , 2005; Miller <i>et al.</i> , 2011; Miller <i>et al.</i> , 2012; Miller <i>et al.</i> , 2013)
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3, O:8	✓	✓	(Roggenkamp <i>et al.</i> , 1996; Kirjavainen <i>et al.</i> , 2008; Schindler <i>et al.</i> , 2012)
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9		✓	(Kirjavainen <i>et al.</i> , 2008)
<i>Yersinia pestis</i>		✓	(Ho <i>et al.</i> , 2014)
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>		✓	(Ho <i>et al.</i> , 2012a; Ho <i>et al.</i> , 2012b)

La adquisición del Factor H y la C4BP por *Leptospira* le permite regular negativamente el sistema del complemento. Las proteínas de *Leptospira* responsables de la captura de los reguladores de complemento podrían ser útiles como antígenos vacunales, al dirigir la respuesta inmune hacia ellas se aumentaría la susceptibilidad de *Leptospira* a la acción del complemento evitando su evasión (Fraga *et al.*, 2014).

Proteínas de *Leptospira* que capturan los reguladores de complemento

El FH y su homólogo FHR-1 son capturados por la adhesina LfhA de *Leptospira* (Verma *et al.*, 2006), que fue también descrita como Lsa24 (Barbosa *et al.*, 2006). LfhA y sus parálogos son lipoproteínas con actividad de lipoendostatina, denominadas Len. LenA y LenB pueden capturar a FH (Stevenson *et al.*, 2007). LenA también interactúa con plasminógeno, generando plasmina, misma que inactiva a C3b, C5 y a IgG (Verma *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2011, Castiblanco-Valencia *et al.*, 2016).

Leptospira captura C4BP por medio de Lsa30 (Barbosa *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2012), Lsa25, Lsa33 (Domingos *et al.*, 2012), y LcpA (Barbosa *et al.*, 2010), antes descrita como proteína hipotética LipL22 (Gamberini *et al.*, 2005), permitiéndole inactivar la acción de las vías clásica y de las lectinas del complemento.

LigA, LigB y Lsa23 capturan tanto Factor H como C4BP además de plasminógeno (Castiblanco-Valencia *et al.*, 2012; Choy, 2012; Siqueira *et al.*, 2013). Recientemente se descubrió que LcpA, puede capturar, además de C4BP, al FH y vitronectina en *L. interrogans* sv. Kennewicki cepa Fromm, *L. interrogans* sv. Copenhageni cepa 10A, *L. interrogans* sv. Pomona cepa Pomona, *L. noguchi* sv. Panama cepa CZ214K, *L. borgpetersenii* sv. Javanica cepa Veldrat Bataviae 46, *L. borgpetersenii* sv. Tarassovi cepa 17, *L. kirschneri* sv. Cynopteri cepa 3522C, y *L. santarosai* sv. Shermani cepa 1342K, lo cual implica la evasión de las tres vías de

activación del complemento y de la polimerización del complejo de ataque de membrana (MAC) (da Silva *et al.*, 2015).

Justificación

La captura de los reguladores negativos del complemento Factor H y C4BP ha sido establecida para algunas especies de *Leptospira*, sin embargo, no se ha esclarecido completamente si existe una correlación lineal entre la capacidad de capturar estos reguladores por *Leptospira* spp. y su sobrevivencia al suero humano normal. Tampoco se conoce si existen diferencias en la captura de Factor H entre leptospiras de bajo y alto pasaje en cultivo de la misma cepa. Las proteínas de *Leptospira* responsables de la captura de los reguladores de complemento pueden ser útiles como antígenos vacunales, al dirigir la respuesta inmune hacia ellas, aumentando la susceptibilidad de *Leptospira* a la acción del complemento evitando su evasión.

Objetivos

General

Determinar si existe una correlación entre la capacidad para capturar el regulador negativo del complemento Factor H por *Leptospira* spp. y su sobrevivencia al suero humano normal.

Específicos

- Determinar la capacidad para capturar el regulador del complemento Factor H por cepas de *Leptospira* spp. de alto y bajo pasaje en cultivo.
- Determinar la sobrevivencia de cepas de *Leptospira* spp. de alto y bajo pasaje en cultivo, al suero humano normal.
- Establecer la correlación entre la captura del Factor H y la sobrevivencia al suero humano normal de leptospiras de alto y bajo pasaje en cultivo

- Determinar la capacidad para capturar el regulador del complemento Factor H por *Leptospira* spp. en cepas de referencia de alto pasaje.
- Determinar la sobrevivencia de *Leptospira* spp. en cepas de referencia de alto pasaje en cultivo, al suero humano normal.
- Establecer la correlación entre la captura del Factor H y la sobrevivencia al suero humano normal de leptospiras en cepas de referencia de alto pasaje.

Hipótesis

La capacidad de *Leptospira* spp. para capturar el Factor H del complemento, es proporcional a su sobrevivencia al suero humano normal.

III. Material y Métodos

Suero humano normal (SHN)

Se obtuvieron muestras de sangre sin anticoagulante de donadores voluntarios sanos, previo consentimiento escrito. Las muestras se dejaron coagular a 4°C durante 3 h, se retiraron los coágulos de manera estéril y se centrifugaron a 2,630 x g' por 5 min. Se realizó un pool con los sueros y se dividieron en alícuotas de 500 µl, que fueron congeladas a -80°C hasta su uso.

Cepas bacterianas

Las cepas de bajo pasaje (BP) y alto pasaje (AP) y la cepa saprófita *L. biflexa* sv. Patoc cepa Patoc I, fueron proporcionadas por el Grupo de Investigación en *Leptospira* y Leptospirosis, a cargo del Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma de CEIEPAA-FMVZ-UNAM. Se consideraron de BP a las cepas que fueron aisladas en medio de cultivo Fletcher a partir de órganos de hámsteres previamente inoculados con *Leptospira* (pase cero). Se consideraron de AP a las cepas con más de 7 pases en cultivo. Las cepas de BP fueron utilizadas entre el primer y sexto pase. (Cuadro 3).

Cuadro 3.- Cepas utilizadas de *Leptospira* spp. de bajo y alto pasaje

Especie	Serovariedad	Cepa	Virulencia	Pasaje
<i>L. interrogans</i>	Canicola	LOCaS 46	Alta	Bajo
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	LOVe 30	Media	Bajo
<i>L. santarosai</i>	Tarassovi	MOCA45	Baja	Bajo
<i>L. interrogans</i>	Canicola	LOCaS 46	Alta	Alto
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	LOVe 30	Media	Alto
<i>L. santarosai</i>	Tarassovi	MOCA45	Baja	Alto
<i>L. biflexa</i>	Patoc	Patoc I	Apatógena	Alto

Adicionalmente, se incluyeron diez de las cepas de *Leptospira* spp. utilizadas en la prueba de aglutinación microscópica (Microagglutination Test: MAT), proporcionadas por el Laboratorio de Diagnóstico de *Leptospira* por el MVZ. Daniel Atilano López del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM. (Cuadro 4).

Cuadro 4.- Cepas de *Leptospira* spp., utilizadas para realizar la prueba de Aglutinación Microscópica en el Depto. de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM

Especie	Serovariedad	Cepa
<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Akiyami A
<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Van Tienen
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Hond Utrecht IV
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Moskva V
<i>L. interrogans</i>	Hardjo	Hardjoprajitno
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	RGA
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Salinem
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Perepelitsin
<i>L. interrogans</i>	Wolffi	3705

En todas las cepas de *Leptospira* (Cuadros 3 y 4) se realizó el pase en cultivo a los 7 días en medio líquido EMJH-modificado y fueron cultivadas a 30°C bajo condiciones aeróbicas (Barbosa *et al.*, 2009).

Evaluación de la capacidad de captura del Factor H por *Leptospira* spp.

Cada cultivo de *Leptospira* fue cuantificado en la cámara de Petroff-Hausser (Hausser Scientific, Horsham, PA, Estados Unidos) en microscopia de campo obscuro. Los cultivos fueron lavados en PBS pH 7.4 a 21°C, centrifugando a 11, 600

x g' por 15 min. Se incubaron 2×10^8 bacterias con 40% de suero humano normal (SHN) en PBS, durante 15 min; a 37°C, la actividad del complemento fue detenida en hielo por 1 min. Enseguida, las suspensiones fueron lavadas tres veces con 500 µl de PBS, pH 7.4, centrifugando a 11,600 x g' por 10 min a 10°C, retirando el sobrenadante y homogeneizando en un agitador tipo vortex. Las pastillas fueron re-suspendidas en 100mM de Na₂CO₃, pH 9.6 y fijadas por duplicado (1×10^8 / pozo) a la placa de ELISA de alta afinidad por 16 h a 4°C (GreinerBioOne, Alemania). Posterior a la incubación, la placa se lavó tres veces con PBS-T (PBS + 0.05% Tween 20, 200 µl/pozo). Para evitar interacciones inespecíficas del anticuerpo, se realizó el bloqueo con 3% de albúmina sérica bovina (BSA) en PBS-T (200 µl/ pozo, 1 h, 37°C). La placa fue lavada una vez con PBS-T y se le agregó el anticuerpo policlonal de oveja anti-Factor H humano [1:5,000, 200 µl/pozo, 1 h a 37°C; (ABcam, Cambridge, Reino Unido)]. Después de la incubación, las placas fueron lavadas tres veces con PBS-T, e incubadas con el anticuerpo de conejo anti-IgG de oveja conjugado con peroxidasa [1: 10,000, 1 h a 37°C; (ABcam, Cambridge, Reino Unido)]. Después de la incubación, las placas fueron nuevamente lavadas tres veces con PBS-T. Finalmente se agregaron 0.0045% de H₂O₂ y 0.004g de OPD [1,2-ortho-phenylenediamine dihydrochloride, (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, Estados Unidos)] en 10 ml de amortiguador citrato fosfato pH 5. La reacción fue detenida con H₂SO₄ (4N, 50µl/pozo). Como control negativo se utilizaron cada una de las serovariedades de *Leptospira* no tratadas con suero, incubada con los anticuerpos primarios y secundarios respectivos. Como control del Factor H se utilizó SHN fijo en la placa (40% en Na₂CO₃, 100mM pH 9.6) y PBS como su control negativo. Las placas fueron leídas a 492 nm en un lector de ELISA (ThermoScientific Multiskan GO, Waltham, MA, Estados Unidos).

Ensayo de sobrevivencia de *Leptospira* al suero humano normal

Se utilizó el procedimiento establecido por Meri *et al.*, 2005 y modificado por Barbosa *et al.*, 2009. Cada cultivo de *Leptospira* fue cuantificado y ajustado a 5×10^6 bacterias. Se retiró el medio por centrifugación (11,600 x g', 10 min, 20°C), la pastilla

se resuspendió con 40% SHN en PBS (200 µl) y se incubó a 37°C, 120 rpm, por 1 h. Enseguida, las suspensiones fueron incubadas en hielo por 1 min para detener la acción del complemento; 20 µl de cada suspensión fueron colocados en 180 µl de medio EMJH modificado en una placa de cultivo de 96 pozos con tapa, la placa fue incubada durante 4 días a 30°C. Al final de este periodo, se cuantificó el desarrollo bacteriano en cámara de Petroff-Hauser en campo oscuro. Como control se realizó el mismo procedimiento con cada una de las cepas de *Leptospira* en 40% SHN-Inactivado (56°C, 30 min) en PBS. Todos los ensayos de sobrevivencia se realizaron por triplicado.

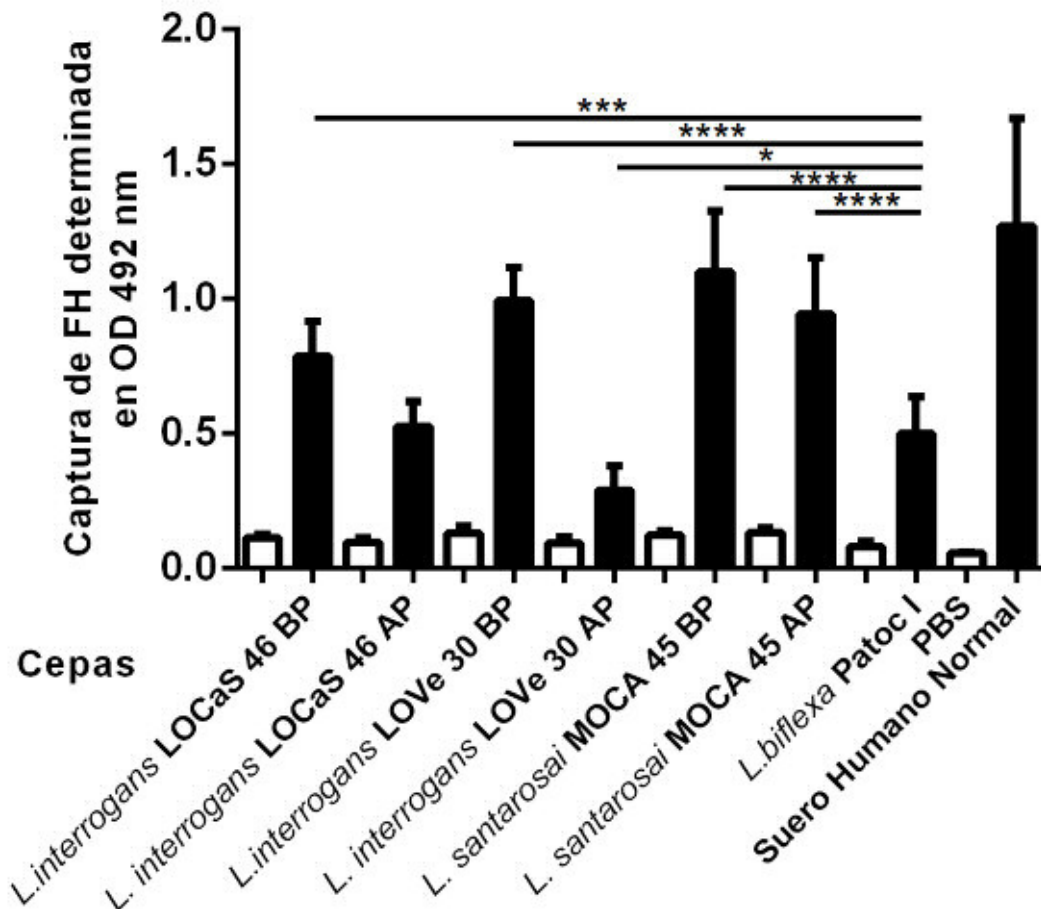
Análisis estadístico

Los resultados de captura de FH (ELISA) y del ensayo de sobrevivencia, así como la correlación captura/sobrevivencia, fueron evaluados con análisis de varianza (ANOVA), prueba de Tukey para determinar diferencias entre los grupos y regresión lineal, utilizando GraphpadPrism 6 ® (Graphpad Software, Inc.).

IV. Resultados

Captura de Factor H por serovariedades de *Leptospira* spp. de bajo y alto pasaje

Todas las serovariedades de *Leptospira* spp capturaron FH sérico con respecto al control negativo (sin suero), siendo menor el valor de captura al FH total en el control positivo (FH presente en 40% SHN). *Leptospira interrogans* sv. Canicola cepa LOCaS 46 de BP capturó más FH que su homólogo de AP ($P \geq 0.005$). Similarmente, *L. interrogans* sv. Icterohaemorrhagiae cepa LOVE 30 de BP capturó más FH que su homólogo de AP ($P \geq 0.00005$). Mientras que *L. santarosai* sv. Tarassovi cepa MOCA 45 de AP y BP no mostraron diferencia ($P < 0.05$). En las cepas de BP, la captura de FH fue mayor en MOCA 45 que en LOCaS 46 ($P \geq 0.00005$); mientras que no hubo diferencia entre LOVE30 y MOCA45, ni entre LOCaS 46 y LOVE30 ($P < 0.05$). En las cepas de alto pasaje la captura de FH fue mayor en MOCA45 que en LOCaS 46 y LOVE30 ($P \geq 0.00005$ en ambas), mientras que LOCaS 46 superó a LOVE 30 ($P \geq 0.05$). Las tres cepas de BP y MOCA45 de AP capturaron más FH que *L. biflexa* sv. Patoc cepa Patoc I ($P \geq 0.0005$ con LOCaS 46 BP y con las otras tres $P \geq 0.00005$). La cepa LOVE30 BP superó a LOCaS 46 AP ($P \geq 0.00005$). MOCA 45 BP superó a LOCaS 46 AP y LOVE 30 AP ($P \geq 0.00005$ en ambas). De manera inesperada, Patoc I capturó FH y superó a LOVE 30 AP ($P \geq 0.05$) (Figura 1).



Cepas	LOCaS 46 BP	LOCaS 46 AP	LOVe 30 BP	LOVe 30 AP	MOCA 45 BP	MOCA 45 AP	Patoc I
LOCaS 46 BP	-	**	-	-	-	-	***
LOCaS 46 AP	-	-	-	*	-	-	-
LOVe 30 BP	-	****	-	****	-	-	****
LOVe 30 AP	-	-	-	-	-	-	-
MOCA 45 BP	***	****	-	****	-	-	****
MOCA 45 AP	-	****	-	****	-	-	****
Patoc I	-	-	-	*	-	-	-

Figura 1.- Captura de Factor H de suero por *Leptospira* spp de bajo y alto pasaje. 2×10^8 *Leptospira interrogans* sv. Canicola cepa LOCaS 46 de bajo y alto pasaje (BP y AP), *L. interrogans* sv. Icterohaemorrhagiae cepa LOVE 30 BP y AP, *Leptospira santarosai* sv. Tarassovi cepa MOCA 45 BP y AP; y *Leptospira biflexa* sv. Patoc cepa Patoc I; fueron incubadas con 40% suero humano normal (SHN), lavadas y fijadas por duplicado (1×10^8 / pozo) a una placa de ELISA. Barras blancas muestran los controles respectivos de bacteria sin SHN. El control positivo fue 40% SHN y su control negativo PBS. La placa fue incubada con anticuerpo policlonal de ovino anti-FH humano 1: 5,000 y con anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG ovina 1: 10,000 (ABCam, Reino Unido). El cuadro muestra las diferencias de la capacidad de captura de FH entre las cepas: - $P < 0.05$, * $P \geq 0.05$, ** $P \geq 0.005$, *** $P \geq 0.0005$, **** $P \geq 0.00005$. La figura muestra el promedio de tres repeticiones independientes del experimento por duplicado.

Sobrevivencia al Suero Humano Normal con serovariedades de bajo y alto pasaje

Las seis cepas patógenas fueron capaces de sobrevivir al SHN, considerando como 100% su desarrollo en SHN inactivado, MOCA45 de AP sobrevivió 70% al SHN, MOCA45 de BP 63%, LOVe30 de BP 59%, LOCaS46 de BP 41% ($P \geq 0.05$), LOCaS46 de AP 26% ($P \geq 0.05$), mientras que LOVe30 de AP 5% ($P \geq 0.005$), resultando la sobrevivencia más baja, cercana al control negativo Patoc I, que no sobrevivió ($P \geq 0.00005$) (Figura 2).

Las cepas de BP LOCaS 46 y LOVe 30 superaron el porcentaje de sobrevivencia de sus contrapartes de AP ($P \geq 0.00005$ en ambas), mientras que las cepas MOCA 45 BP y AP no mostraron diferencia entre sí ($P < 0.05$). La cepa LOCaS 46 de BP superó a LOVe 30 de AP ($P \geq 0.00005$). LOVe 30 BP superó a LOCaS 46 AP y BP ($P \geq 0.00005$ en ambas). MOCA 45 de AP y BP superaron a LOCaS 46 de AP y BP así como a LOVe 30 de AP ($P \geq 0.00005$ en las tres). Patoc I no sobrevivió al SHN por lo que fue superada por la mayoría de las serovariedades de este experimento ($P \geq 0.00005$) excepto LOVe 30 AP ($P < 0.05$) (Figura 3).

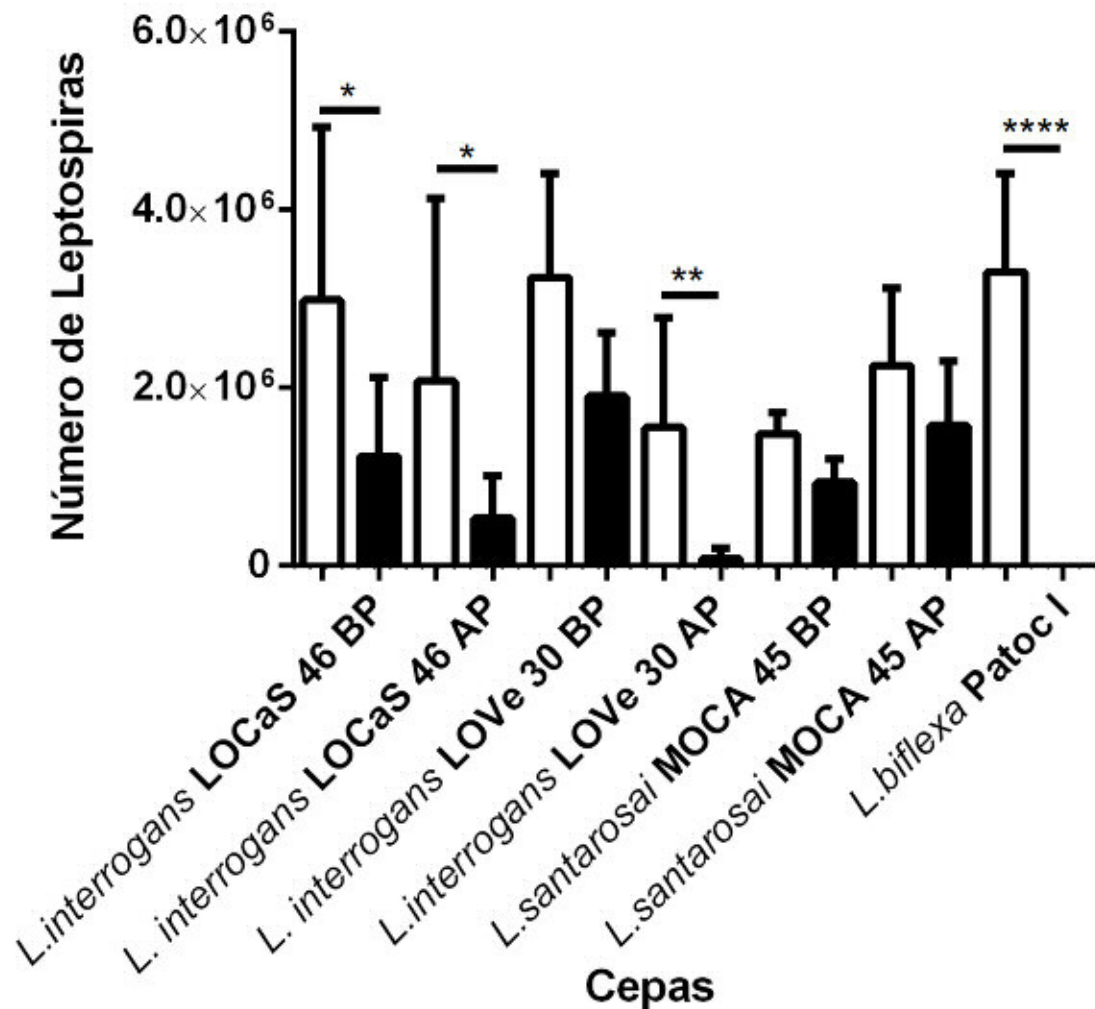
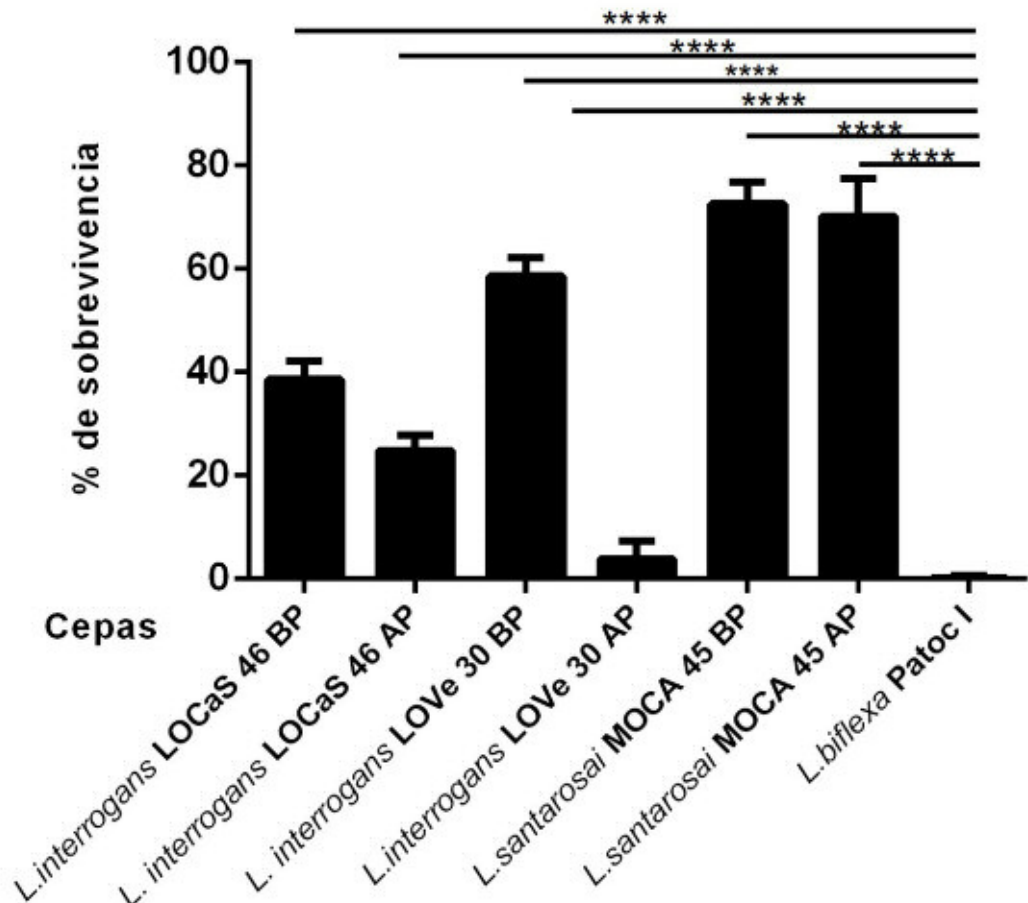


Figura 2.-Sobrevivencia de *Leptospira spp* de bajo y alto pasaje a suero humano normal. 5×10^6 *Leptospira interrogans* sv. Canicola cepa LOCaS 46 de bajo y alto pasaje (BP y AP), *L. interrogans* sv. Icterohaemorrhagiae cepa LOVe 30 BP y AP, *Leptospira santarosai* sv. Tarassovi cepa MOCA 45 BP y AP; y *Leptospira biflexa* sv. Patoc cepa Patoc I, fueron incubadas con 40% SHN (1 hora a 37°C, y después 1 minuto a 4°C), diluidas 1:10 en EMJH modificado e incubadas (4 días a 30°C). Como control se consideró como 100% su desarrollo bajo las mismas condiciones, pero en SHN inactivado por calor (56°C por 30 min) para cada una de las siete cepas (barras blancas). * $P \geq 0.05$, ** $P \geq 0.005$, **** $P \geq 0.00005$. La figura muestra el promedio de cuatro repeticiones independientes del experimento por triplicado.

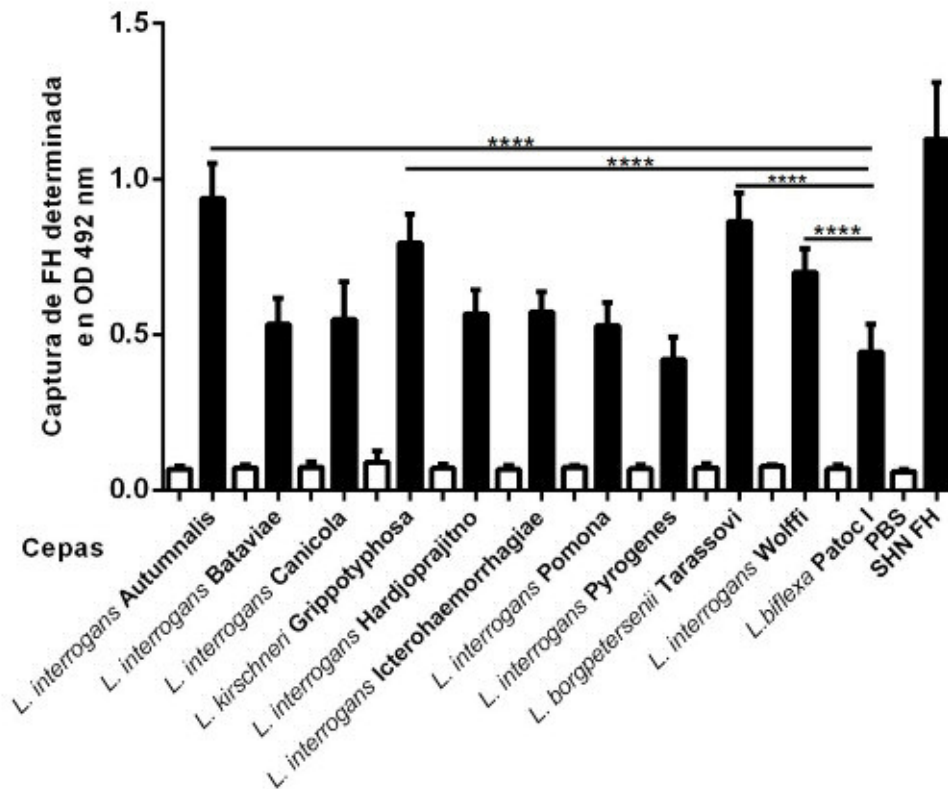


Cepas	LOCaS 46 BP	LOCaS 46 AP	LOVe 30 BP	LOVe 30 AP	MOCA 45 BP	MOCA 45 AP	Patoc I
LOCaS 46 BP	-	****	-	****	-	-	****
LOCaS 46 AP	-	-	-	-	-	-	****
LOVe 30 BP	****	****	-	****	-	-	****
LOVe 30 AP	-	-	-	-	-	-	-
MOCA 45 BP	****	****	-	****	-	-	****
MOCA 45 AP	****	****	-	****	-	-	****
Patoc I	-	-	-	-	-	-	-

Figura 3.- Porcentaje de sobrevivencia de *Leptospira* spp de bajo y alto pasaje a suero humano normal. 5×10^6 *Leptospira interrogans* sv. Canicola cepa LOCaS 46 de bajo y alto pasaje (BP y AP), *L. interrogans* sv. Icterohaemorrhagiae cepa LOVe 30 BP y AP, *Leptospira santarosaj* sv. Tarassovi cepa MOCA 45 BP y AP; y *Leptospira biflexa* sv. Patoc cepa Patoc I, fueron incubadas con 40% SHN (1 hora a 37°C, y después 1 minuto a 4°C), diluidas 1:10 en EMJH modificado e incubadas (4 días a 30°C). Como control se consideró como 100% su desarrollo bajo las mismas condiciones, pero en SHN inactivado por calor (56°C por 30 min) para cada una de las siete cepas (barras blancas). En el cuadro se describen las diferencias en sobrevivencia a SHN entre cepas. - $P < 0.05$, **** $P \geq 0.00005$. La figura muestra el promedio de cuatro repeticiones independientes del experimento por triplicado

Captura de Factor H por diez serovariedades de *Leptospira* spp. de alto pasaje

Las diez serovariedades de *Leptospira* utilizadas en la MAT capturaron FH sérico comparadas con el control negativo (sin suero), siendo menor el valor de captura al FH total en el control positivo (FH presente en 40% SHN). *L. interrogans* sv. Autumnalis cepa Akiyami A, capturó más FH que casi todas las serovariedades [$P \geq 0.00005$, *L. kirschneri* sv Grippytyphosa cepa Moskva V ($P \geq 0.0005$)], mientras que no superó a *L. borgpetersenii* sv. Tarassovi cepa Perepelitsin ($P < 0.05$). *L. interrogans* sv. Canicola cepa Hond Utrecht IV superó en la captura de FH a *L. interrogans* sv. Pyrogenes cepa Salinem ($P \geq 0.005$). Grippytyphosa capturó más FH que las serovariedades de *L. interrogans*: Bataviae, Canicola, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes, así como *L. biflexa* sv. Patoc cepa Patoc I (todas $P \geq 0.00005$). Hardjo e. Icterohaemorrhagiae superaron en captura de FH a Pyrogenes (ambas $P \geq 0.0005$). Tarassovi superó a casi todas las serovariedades. [$P \geq 0.00005$, *L. interrogans* sv Wolffi cepa 3705 ($P \geq 0.0005$)], mientras que no superó a las serovariedades. Autumnalis y Grippythyphosa (ambas $P < 0.05$). Wolffi capturó más FH que casi todas las serovariedades [Pyrogenes y Patoc $P \geq 0.00005$, Pomona $P \geq 0.0005$, Bataviae y Canicola $P \geq 0.005$, Hardjo e Icterohaemorrhagiae $P \geq 0.05$], pero no superó a Autumnalis, Grippytyphosa y Tarassovi (las tres $P < 0.05$) (Figura 4).



SVS	Aut	Bat	Can	Gri	Hpj	Ict	Pom	Pyr	Tar	Wol	Patoc I
Aut	-	****	****	***	****	****	****	****	-	****	****
Bat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Can	-	-	-	-	-	-	-	**	-	-	-
Gri	-	****	****	-	****	****	****	****	-	-	****
Hpj	-	-	-	-	-	-	-	***	-	-	-
Ict	-	-	-	-	-	-	-	***	-	-	-
Pom	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tar	-	****	****	-	****	****	****	****	-	***	****
Wol	-	**	**	-	*	*	***	****	-	-	****
Patoc I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figura 4.- Captura de Factor H por diez serovariedades de *Leptospira* spp. de alto pasaje. 2×10^8 *L. interrogans* sv. Autumnalis cepa Akiyami A, *L. interrogans* sv. Bataviae cepa Van Tienen, *L. interrogans* sv. Canicola cepa Hond Utrecht IV, *L. kirschneri* sv. Grippotyphosa cepa Moskva V, *L. interrogans* sv. Hardjo cepa Hardjoprajitno, *L. interrogans* sv. Icterohaemorrhagiae cepa RGA, *L. interrogans* sv. Pomona cepa Pomona, *L. interrogans* sv. Pyrogenes cepa Salinem, *L. borgpetersenii* sv. Tarassovi cepa Pepepelitsin, *L. interrogans* sv. Wolffi cepa 3705 y *L. biflexa* sv. Patoc cepa Patoc I; fueron incubadas con 40% suero humano normal (SHN), lavadas y fijadas por duplicado (1×10^8 / pozo) a una placa de ELISA. Barras blancas muestran los controles respectivos de bacteria sin SHN. El control positivo fue 40% SHN y su control negativo PBS. La placa fue incubada con anticuerpo policlonal de ovino anti-FH humano 1: 5,000 y con anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG ovina 1: 10,000 (ABCam, Reino Unido). El cuadro muestra las diferencias de la capacidad de captura de FH entre las cepas: - $P < 0.05$, * $P \geq 0.05$, ** $P \geq 0.005$, *** $P \geq 0.0005$, **** $P \geq 0.00005$. La figura muestra el promedio de cinco repeticiones del experimento por duplicado.

Sobrevivencia de diez serovariedades de *Leptospira* spp., de alto pasaje al suero humano normal

Cuatro de las diez serovariedades enfrentadas al SHN mostraron porcentajes de sobrevivencia superiores al 30% tomando como 100% el desarrollo bacteriano en SHN inactivado con calor: Autumnalis sobrevivió 69%, Grippytyphosa 63%, Canicola 35% ($P \geq 0.0005$) y Tarassovi 31%; tres serovariedades mostraron sobrevivencia mayor al 10%: Wolffii con 16%, Pyrogenes con 14% y Bataviae con 12%; mientras que Pomona presentó sobrevivencia de 1%, Hardjo ($P \geq 0.0005$) e Icterohaemorrhagiae no sobrevivieron (0%), igual que el control Patoc I (Figura 5).

La serovariedad Autumnalis sobrevivió más que la mayoría de serovariedades [$P \geq 0.00005$, para Tarassovi ($P \geq 0.005$)] excepto Grippytyphosa ($P < 0.05$). Canicola mostró mayor sobrevivencia que Hardjoprajitno, Icterohaemorrhagiae, Pomona y Patoc I ($P \geq 0.005$). Grippytyphosa mostró mayor sobrevivencia que casi todas las serovariedades [$P \geq 0.00005$, para Tarassovi ($P \geq 0.005$)] excepto Autumnalis y Canicola ($P < 0.05$). A su vez, Tarassovi sobrevivió más que Bataviae ($P \geq 0.005$), Hardjoprajitno ($P \geq 0.0005$), Icterohaemorrhagiae, Pomona y Patoc I ($P \geq 0.00005$), Pyrogenes ($P \geq 0.05$), pero no hubo diferencia con Canicola, Grippytyphosa y Wolffii ($P < 0.05$) (Figura 6).

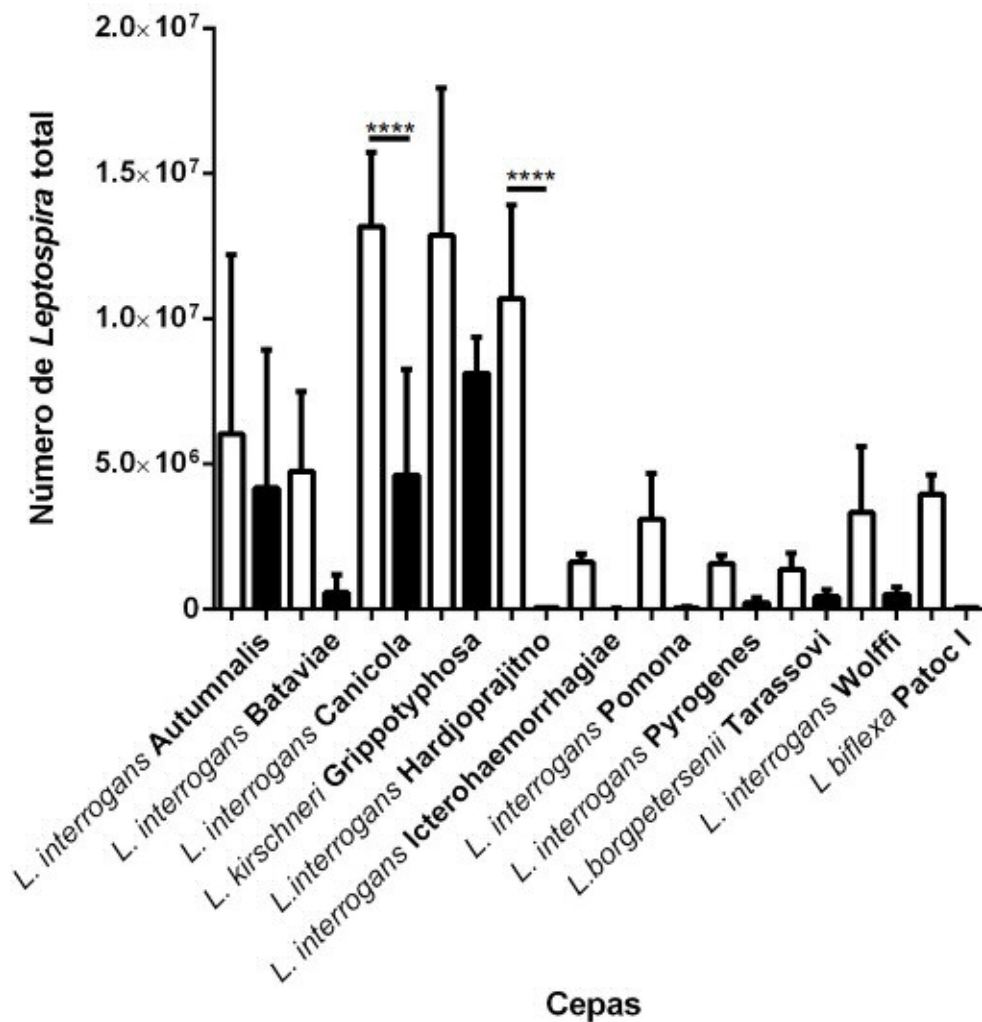
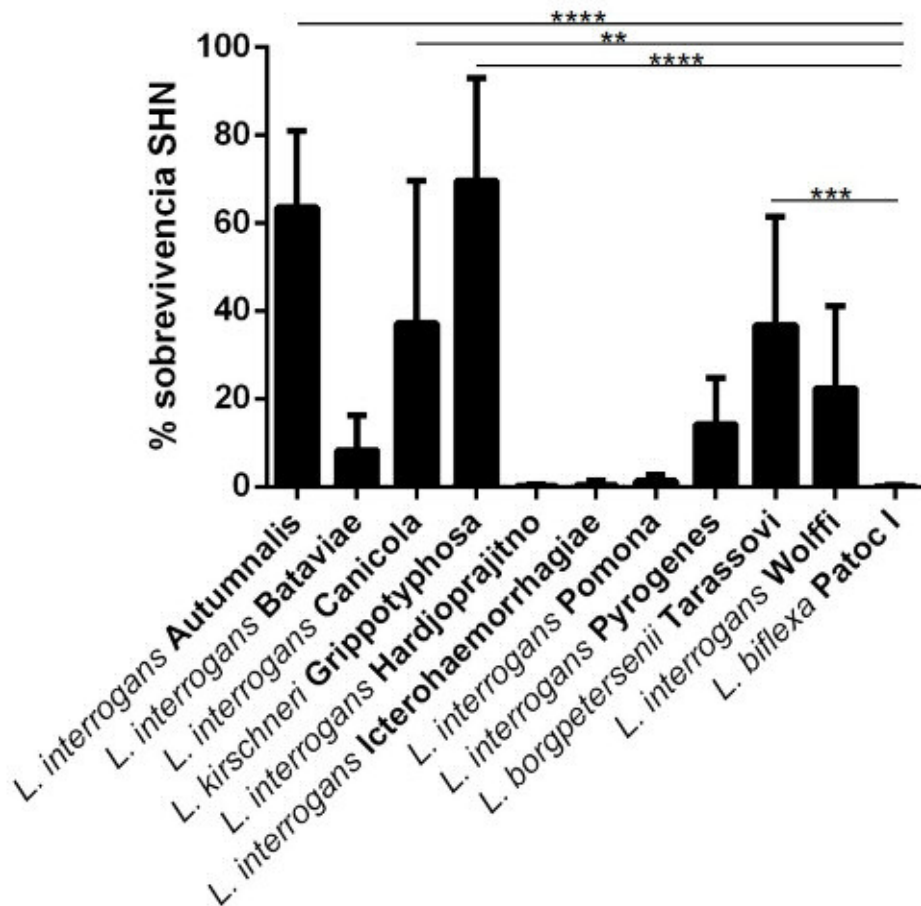


Figura 5.- Sobrevivencia de diez serovariedades de leptospiras de alto pasaje al suero humano normal. 5×10^6 de *L. interrogans* sv. Autumnalis cepa Akiyami A, *L. interrogans* sv. Bataviae cepa Van Tienen, *L. interrogans* sv. Canicola cepa Hond Utrecht IV, *L. kirschneri* sv. Grippotyphosa cepa Moskva V, *L. interrogans* sv. Hardjo cepa Hardjoprajitno, *L. interrogans* sv. Icterohaemorrhagiae cepa RGA, *L. interrogans* sv. Pomona cepa Pomona, *L. interrogans* sv. Pyrogenes cepa Salinem, *L. borgpetersenii* sv. Tarassovi cepa Pepepelitsin, *L. interrogans* sv. Wolffi cepa 3705y *L. biflexa* sv. Patoc cepa Patoc I fueron incubadas con 40% SHN (1 hora a 37°C, y después 1 minuto a 4°C), diluidas 1:10 en EMJH modificado e incubadas (4 días a 30°C). Como control se consideró como 100% su desarrollo bajo las mismas condiciones, pero en SHN inactivado por calor (56°C por 30 min) para cada una de las once cepas (barras blancas). **** $P \geq 0.00005$. La figura muestra el promedio de cuatro repeticiones independientes del experimento por triplicado



SVS	Aut	Bat	Can	Gri	Hpj	Ict	Pom	Pyr	Tar	Wol	Patoc I
Aut	-	****	****	-	****	****	****	****	****	****	****
Bat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Can	-	-	-	-	**	**	**	-	-	-	**
Gri	-	****	-	-	****	****	****	****	**	****	****
Hpj	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ict	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pom	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tar	-	**	-	-	***	****	****	*	-	-	****
Wol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Patoc I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figura 6.-Porcentaje de sobrevivencia de diez serovariedades de leptospiras de alto pasaje al suero humano normal. 5 X 10⁶ de *L. interrogans* sv. Autumnalis cepa Akiyami A, *L. interrogans* sv. Bataviae cepa Van Tienen, *L. interrogans* sv. Canicola cepa Hond Utrecht IV, *L. kirschneri* sv. Grippotyphosa cepa Moskva V, *L. interrogans* sv. Hardjo cepa Hardjoprajitno, *L. interrogans* sv. Icterohaemorrhagiae cepa RGA, *L. interrogans* sv. Pomona cepa Pomona, *L. interrogans* sv. Pyrogenes cepa Salinem, *L. borgpetersenii* sv. Tarassovi cepa Pepepelitsin, *L. interrogans* sv. Wolffi cepa 3705 y *Leptospira biflexa* sv Patoc cepa Patoc I, fueron incubadas con 40% SHN (1 hora a 37°C, y después 1 minuto a 4°C), diluidas 1:10 en EMJH modificado e incubadas (4 días a 30°C). Como control se consideró como 100% su desarrollo bajo las mismas condiciones, pero en SHN inactivado por calor (56°C por 30 min) para cada una de las once cepas (barras blancas). En el cuadro se describen las diferencias en sobrevivencia a SHN entre cepas. - P < 0.05, * P ≥ 0.05, ** P ≥ 0.005, *** P ≥ 0.0005, **** P ≥ 0.00005 La figura muestra el promedio de cuatro repeticiones independientes del experimento por triplicado

Correlación entre la captura de Factor H y la sobrevivencia de leptospiras de alto y bajo pasaje al suero humano normal

Los resultados de los experimentos de captura de FH fueron convertidos a porcentaje, considerando como 100% el valor de FH total presente en el SHN (OD 492 nm). La sobrevivencia al SHN fue determinada por conteo directo en cámara de Petroff-Hausser y se convirtió a porcentaje considerando como 100% el desarrollo de *Leptospira* en SHN inactivado. Los valores obtenidos se transformaron a su arcoseno respectivo, las cepas que se mantuvieron más próximas a la recta de correlación fueron LOCaS 46 y LOVe30 de AP, seguidas de LOCaS 46 y LOVe30 de BP, posteriormente Patoc I, MOCA45 de AP y BP se acercaron a las líneas de traspolación. Las serovariedades de *Leptospira* evaluadas mostraron proximidad a la recta de correlación, con una regresión de $R^2= 0.8593$. (Figura 7)

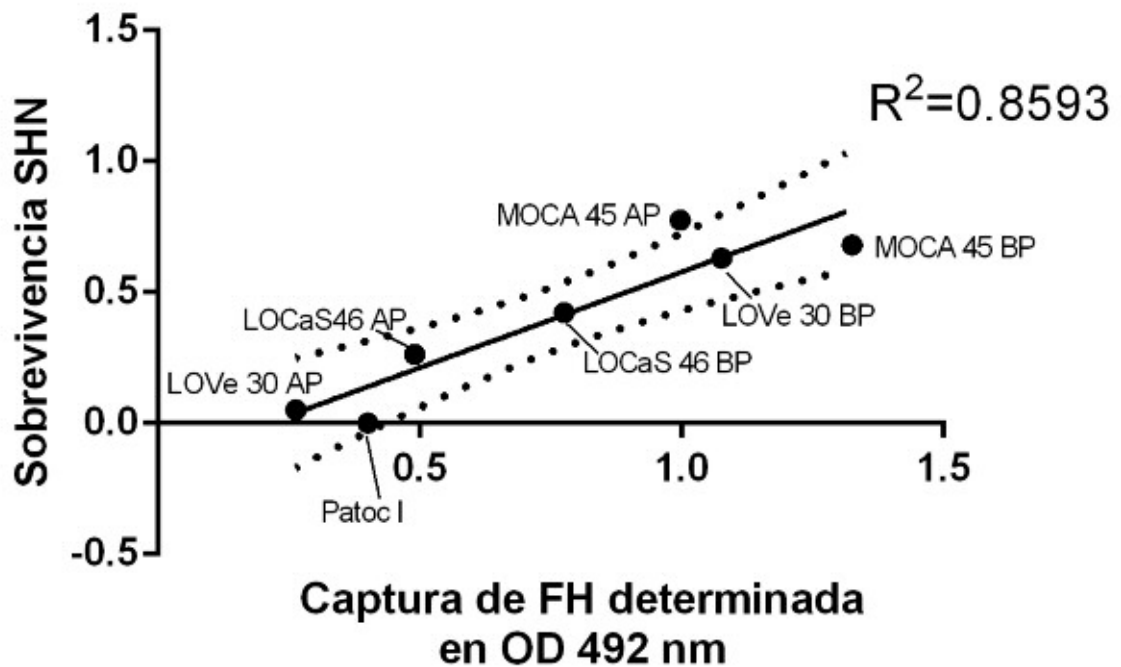


Figura 7.- Correlación entre la captura de Factor H y la sobrevivencia de leptospiras de alto y bajo pasaje al suero humano normal. Los resultados de captura de FH convertidos a porcentaje, considerando como 100% el valor de FH total presente en el SHN (OD 492 nm), y la sobrevivencia al SHN convertida a porcentaje, considerando como 100% el desarrollo de *Leptospira* en SHN inactivado, de *Leptospira interrogans* sv. Canicola cepa LOCaS 46, *L. interrogans* sv. Icterohaemorrhagiae cepa LOVE 30 y *Leptospira santarosai* sv. Tarassovi cepa MOCA 45 de alto y bajo pasaje (AP y BP respectivamente), así como *L. biflexa* sv. Patoc cepa Patoc I; fueron correlacionadas por regresión lineal. El valor de R^2 indica que existe correlación entre captura y sobrevivencia si es próximo a 1, así como la proximidad de los puntos a la recta de ajuste.

Correlación entre la captura de Factor H y la sobrevivencia de leptospiras de alto pasaje al suero humano normal

Los resultados de los experimentos de captura de FH fueron convertidos a porcentaje, considerando como 100% el valor en OD 492 nm de los pozos de FH total presente en el SHN. La sobrevivencia al SHN fue determinada por conteo directo en cámara de Petroff-Hausser y se convirtió a porcentaje considerando como 100% el desarrollo de *Leptospira* en SHN inactivado. Los valores obtenidos se transformaron a su arcoseno respectivo, las cepas que se mantuvieron más próximas a la recta de correlación fueron Patoc I y Bataviae, mientras que Pomona, Hardjoprajitno, Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes, Tarassovi y Autumnalis, se colocaron dentro de las líneas de traspelación; posteriormente Grippotyphosa, Canicola, y Wolffi se mantuvieron próximas, pero fuera de las líneas de traspelación. Las serovariedades de *Leptospira* evaluadas mostraron una regresión de $R^2=0.6040$. (Figura 8)

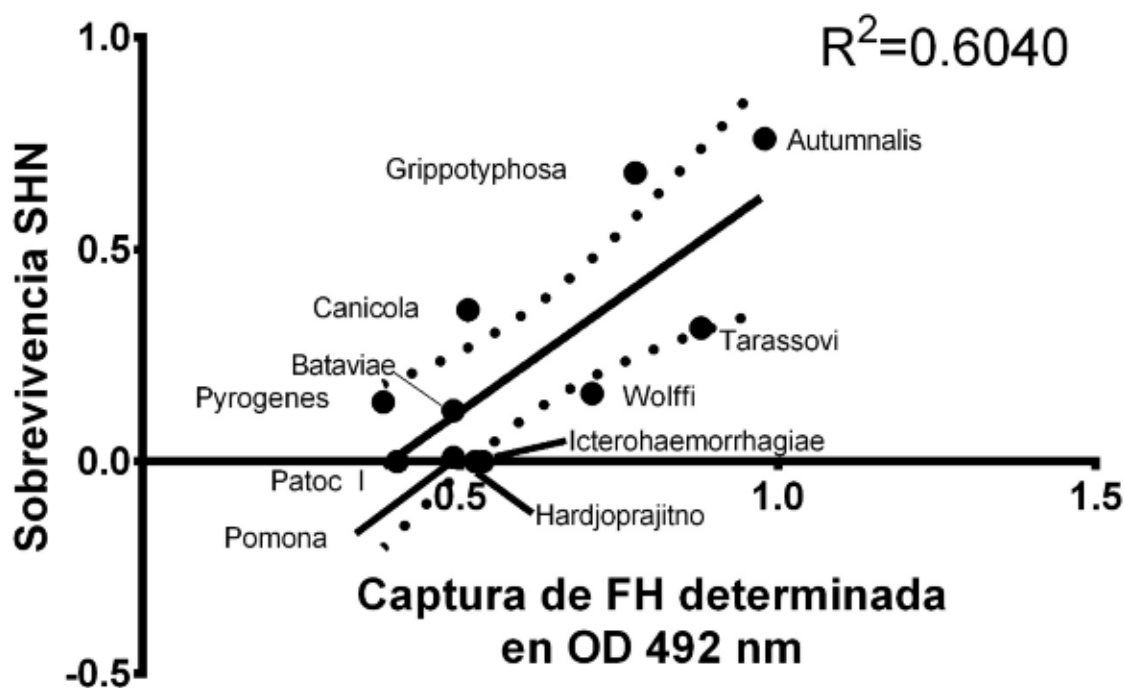


Figura 8.- Correlación entre la captura de Factor H y la sobrevivencia de leptospiras de alto pasaje al suero humano normal. Los resultados de captura de FH convertidos a porcentaje, considerando como 100% el valor de FH total presente en el SHN (OD 492 nm), y la sobrevivencia al SHN convertida a porcentaje, considerando como 100% el desarrollo de *Leptospira* en SHN inactivado, de *L. interrogans* sv. Autumnalis cepa Akiyami A, *L. interrogans* sv. Bataviae cepa Van Tienen, *L. interrogans* sv. Canicola cepa Hond Utrecht IV, *L. kirschneri* sv. Grippytyphosa cepa Moskva V, *L. interrogans* sv. Hardjo cepa Hardjoprajitno, *L. interrogans* sv. Icterohaemorrhagiae cepa RGA, *L. interrogans* sv. Pomona cepa Pomona, *L. interrogans* sv. Pyrogenes cepa Salinem, *L. borgpetersenii* sv. Tarassovi cepa Pepepelitsin, *L. interrogans* sv. Wolffi cepa 3705, así como *L. biflexa* sv. Patoc cepa Patoc I, fueron correlacionadas por regresión lineal. El valor de R^2 indica que existe correlación entre captura y sobrevivencia si es próximo a 1, así como la proximidad de los puntos a la recta de ajuste.

V. Discusión y conclusiones

Discusión

El FH es un regulador negativo del complemento, descrito por Whaley y Ruddy en 1976, que tiene afinidad por C3b y actúa a nivel de la convertasa de C3 de la vía alterna del complemento (C3bBb); previene su ensamble al evitar la unión de Factor B a C3b, disocia la convertasa (C3bBb) separando Bb de C3b y actúa como cofactor del factor I en la degradación de C3b. La captura de FH humano por parte de serovariedades patógenas de *Leptospira* fue reportada por Meri *et al.*, en 2005. La primera proteína de unión a FH de *Leptospira* fue descrita independientemente por Verma *et al.*, 2006 como LfhA y por Barbosa *et. al.*, 2006 como Lsa24. Más tarde, esta adhesina fue renombrada como LenA por Stevenson *et al.*, 2007, quienes además encontraron el parólogo LenB con actividad similar. Posteriormente, Castiblanco- Valencia *et. al.* 2012 y Choy, 2012 reportaron que las proteínas LigA y LigB son capaces de capturar al FH; Siqueira *et. al.*, 2015 determinaron que Lsa23 también liga FH y da Silva *et. al.*, 2015, reportaron que la proteína de unión a C4BP LcpA, descrita previamente por Barbosa *et al.* 2009, es capaz de ligar además FH y vitronectina. En el presente estudio evaluamos la capacidad de captura de FH por *Leptospira* spp. y lo correlacionamos con su sobrevivencia al SHN.

Meri *et. al.*, en 2005, realizaron ensayos de sobrevivencia de *Leptospira* a 40% SHN a 37°C durante unos segundos, dos y cuatro horas previas a la lectura. Barbosa *et. al.*, en 2009 realizó modificaciones al experimento de Meri: las leptospiras fueron expuestas por una hora a 40% SHN a 37°C, se incubó un minuto en hielo para detener la acción del complemento y enseguida se tomaron 20µl de esta reacción y se cultivaron por 4 días en 180 µl de EMJH modificado, procediendo a su lectura en cámara de Petroff-Hausser en microscopía de campo oscuro. En el presente estudio el ensayo de sobrevivencia se realizó de manera similar al protocolo de Barbosa.

Barbosa *et al.* 2009, evaluaron la sobrevivencia de 6 serovariedades de 5 especies de *Leptospira*, de las cuales *L. interrogans* serovariedad Kennewicki cepa Fromm

de bajo pasaje y *L. kirshneri* serovariedad Cynopteri cepa 3522C de alto pasaje fueron resistentes a SHN. Similarmente, Meri *et al.*, en 2005, no encontraron diferencias en la sobrevivencia al SHN entre las cepas de alto y bajo pasaje de las serovariedades patógenas de *Leptospira* probadas; sin embargo, ambos grupos encontraron que las cepas que capturan más eficientemente FH son menos susceptibles al SHN. *L. biflexa* serovariedad Patoc no capturó FH y fue susceptible al SHN. En nuestro estudio encontramos diferencias significativas tanto en la capacidad de captura de FH como en la sobrevivencia al SHN, entre las cepas de BP y AP LOCaS46 (virulencia alta) y LOVe30 (virulencia media); las cepas de BP mostraron una mayor capacidad de captura de FH y consistentemente una mayor sobrevivencia al SHN en comparación a las cepas de AP. Las cepas MOCA 45 (virulencia baja) de BP y AP no presentaron diferencias en captura de FH ni en sobrevivencia al SHN, comportándose ambas con altos niveles de captura de FH y de sobrevivencia al SHN. Es posible que MOCA 45 de AP mantenga la capacidad de captura de FH debido a que el número de pasajes en cultivo no es muy alto. MOCA 45 de AP tiene alrededor de 20 pases en cultivo¹, tal vez esté asociado con el nivel de expresión de proteínas que capturan FH. Por otra parte, Barbosa *et al.*, 2009 encontraron que la cepa Pomona tuvo una sobrevivencia de 55% al SHN. En contraste, en nuestro estudio la sobrevivencia de la cepa Pomona sólo alcanzó el 1% después de una hora post-exposición al SHN, posiblemente asociado a la diferencia en el número de pasajes de la cepa u otras diferencias técnicas. Similar a lo encontrado por Meri *et al.*, 2005 y Barbosa *et al.*, 2009, la captura de FH de SHN observada en Patoc I fue baja y no sobrevivió al SHN. Nosotros observamos un comportamiento similar en la cepa LOVe 30 de AP.

Se analizaron las diferencias en la capacidad de captura de FH de SHN entre las serovariedades de alto pasaje utilizadas en la prueba de aglutinación microscópica; dos de diez cepas (Autumnalis y Grippytyphosa), mostraron alta capacidad para capturar el FH y en consecuencia fueron resistentes al SHN, en contraste, seis

¹ Dr. Carlos Alfredo Carmona Gasca, comunicación personal

cepas (Bataviae, Canicola, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona y Pyrogenes) mostraron menor capacidad de captura de FH y consecuentemente fueron susceptibles al SHN. Los aislados mexicanos de Canicola (LOCaS 46) e Icterohaemorrhagiae (LOVe 30) de AP mostraron mayor capacidad de captura de FH que sus contrapartes de referencia usadas en la prueba de aglutinación microscópica (Canicola Hond Utrecht IV e Icterohaemorrhagiae RGA).

Inesperadamente, *L. borgpetersenii* sv. Tarassovi cepa Perepelitsin no mostró una asociación entre el perfil de captura de FH y la sobrevivencia al SHN como las otras serovariedades de alto pasaje, mostrando alta captura de FH y baja sobrevivencia al SHN; capturando de manera similar a las cepas *L. santarosai* sv. Tarassovi cepa MOCA45 de BP y AP, pero con una sobrevivencia menor que estas cepas. *L. interrogans* sv. Wolffi cepa 3705 también mostró alta captura de FH y baja sobrevivencia. Por lo que, para tratar de resolver estas inconsistencias, fueron evaluados los perfiles de sobrevivencia al SHN a 30°C y 37°C, observando un detrimento en la sobrevivencia a 37°C. Esto posiblemente esté asociado a la susceptibilidad a la temperatura de estas cepas, y a los altos pasajes a los que han sido sometidas [Tarassovi Perepelitsin fue aislada en 1938 (Terskikh *et al.* 1941) y MOCA 45 fue aislada en 2009 (Carmona-Gasca, 2011)]. *L. santarosai* serovariedad Tarassovi cepa MOCA 45 de BP y AP sí resistieron la temperatura de 37°C y la acción del SHN.

El perfil de captura de FH y la sobrevivencia al SHN de las cepas de BP y AP LOCaS46, LOVe30, MOCA45, y la cepa saprófita Patoc I, sugieren una correlación positiva con un valor de $R^2=0.8593$. El alto perfil de captura de FH y la alta sobrevivencia al SHN de las serovariedades de AP Autumnalis y Grippothyphosa, así como la menor captura y baja sobrevivencia al SHN de las serovariedades de AP Bataviae, Canicola, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes y Patoc sugieren una correlación positiva captura/sobrevivencia con un valor de $R^2=0.6040$.

Matsunaga *et al.* 2003 observaron la pérdida de la expresión de las proteínas LigA y LigB en leptospiras de AP de la cepa de *L. kirschneri* serovariedad Grippotyphosa

cepa RM52 en pasajes *in vitro*, y su expresión *in vivo* durante el proceso de infección. Castiblanco-Valencia et. al., en 2016, transformaron la cepa saprófita *L. biflexa* serovariedad Patoc cepa Patoc I con los genes de LigA y LigB, confiriendo a Patoc I la capacidad de captura de FH y sobrevivencia al SHN. Nosotros observamos que las cepas LOCaS 46 y LOVe 30 de BP ligan más eficientemente FH y sobreviven más al SHN que las de AP; consistentemente, observamos una menor capacidad de ligado de FH en las serovariedades de alto pasaje (*Bataviae*, *Hardjo*, *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona* y *Pyrogenes*), que no sobrevivieron al SHN. Adicionalmente, *Canicola* Hond Utrecht IV captura FH a nivel medio y sobrevive medianamente al SHN. Sin embargo, observamos alta captura de FH y alta sobrevivencia al suero en las cepas MOCA 45 de BP y AP, y en las serovariedades de AP *Autumnalis* Akiyami A y *Grippotyphosa* Moskva V. Incongruentemente, las serovariedades *Tarassovi* Perepelitsin y *Wolffi* 3705 mostraron alta captura de FH, pero no sobrevivieron al SHN.

Conclusiones

La mayoría de nuestras observaciones sugieren que la sobrevivencia de *Leptospira* al suero humano normal correlaciona con la captura de Factor H, evidenciando la importancia de evadir la vía alterna del complemento para la sobrevivencia del microorganismo.

Las serovariedades de *Leptospira* con bajo pasaje en cultivo y virulencias alta y media, capturan FH y sobreviven a la acción del complemento presente en SHN, más que sus contrapartes de alto pasaje en cultivo.

Las serovariedades que capturan eficientemente al FH logran sobrevivir al SHN, las que no capturan eficientemente el FH, no sobreviven a la acción del complemento.

La captura de FH y la sobrevivencia al SHN de *L. borgpetersenii* serovariedad *Tarassovi* cepa Perepelitsin y *L. interrogans* serovariedad *Wolffi* cepa. 3702 no correlacionaron.

Es importante evaluar la interacción de otros reguladores del complemento como C4BP y vitronectina con *Leptospira* para conocer su contribución a la sobrevivencia al SHN.

VI. Referencias

1. ABUAUAD, C., OSORIO, G., ROJAS, J. y PINO, L. 2005. Leptospirosis: Presentación de una infección fulminante y revisión de la literatura. *Rev Chil Infect*, 22, 93-97.
2. ADINOLFI, M., DOBSON, N. C. and BRADWELL, A. R. 1981. Synthesis of Two Components of Human Complement, β 1h And C3bINA, During Fetal Life. *Acta Paediatr Scand*, 71, 705-710.
3. ADLER, B. and DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol*, 140, 287-96.
4. ADLER, B. and FAINE, S. 2006. The Genus *Leptospira*. *Prokaryotes*, 7, 294-317.
5. AGARWAL, S., RAM, S., NGAMPASUTADOL, J., GULATI, S., ZIPFEL, P. F. and RICE, P. A. 2010. Factor H facilitates adherence of *Neisseria gonorrhoeae* to complement receptor 3 on eukaryotic cells. *J Immunol*, 185, 4344-53.
6. AMDAHL, H., JARVA, H., HAANPERA, M., MERTSOLA, J., HE, Q., JOKIRANTA, T. S. and MERI, S. 2011. Interactions between *Bordetella pertussis* and the complement inhibitor factor H. *Mol Immunol*, 48, 697-705.
7. ANDRE-FONTAINE, G. 2006. Canine leptospirosis- do we have a problem? *Vet Microbiol*, 117, 19-24.
8. ATZINGEN, M. V., BARBOSA, A. S., DE BRITO, T., VASCONCELLOS, S. A., DE MORAIS, Z. M., LIMA, D. M., ABREU, P. A. and NASCIMENTO, A. L. 2008. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. *BMC Microbiol*, 8, 70.
9. ATZINGEN, M. V., GOMEZ, R. M., SCHATTNER, M., PRETTE, G., GONCALES, A. P., DE MORAIS, Z. M., VASCONCELLOS, S. A. and NASCIMENTO, A. L. 2009. Lp95, a novel leptospiral protein that binds extracellular matrix components and activates e-selectin on endothelial cells. *J Infect*, 59, 264-76.
10. BAJIC, G., DEGN, S. E., THIEL, S. and ANDERSEN, G. R. 2015. Complement activation, regulation, and molecular basis for complement-related diseases. *EMBO J*, 34, 2735-57.
11. BARBOSA, A. S., ABREU, P. A., NEVES, F. O., ATZINGEN, M. V., WATANABE, M. M., VIEIRA, M. L., MORAIS, Z. M., VASCONCELLOS, S. A. and NASCIMENTO, A. L. 2006. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. *Infect Immun*, 74, 6356-64.
12. BARBOSA, A. S., ABREU, P. A., VASCONCELLOS, S. A., MORAIS, Z. M., GONCALES, A. P., SILVA, A. S., DAHA, M. R. and ISAAC, L. 2009. Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human complement regulator C4BP. *Infect Immun*, 77, 1137-43.
13. BARBOSA, A. S., MONARIS, D., SILVA, L. B., MORAIS, Z. M., VASCONCELLOS, S. A., CIANCIARULLO, A. M., ISAAC, L. and ABREU,

- P. A. 2010. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. *Infect Immun*, 78, 3207-16.
14. BARNETT, J. K., BARNETT, D., BOLIN, C. A., SUMMERS, T. A., WAGAR, E. A., CHEVILLE, N. F., HARTSKEERL, R. & HAAKE, D. A. 1999. Expression and Distribution of Leptospiral Outer Membrane Components during Renal Infection of Hamsters. *Infection and Immunity*, 67, 853-861.
 15. BERGGÅRD, K., JOHNSON, E., MOOI, F. R. and LINDAHL, G. 1997. *Bordetella pertussis* Binds the Human Complement Regulator C4BP: Role of Filamentous Hemagglutinin. *Infection and Immunity*, 65, 3638-3643.
 16. BERGGÅRD, K., LINDAHL, G., DÄLBACK, B. and BLOM, A. M. 2001. *Bordetella pertussis* binds to human C4b-binding protein (C4BP) at a site similar to that used by the natural ligand C4b. *eur. J. Immunol.*, 31, 2771-2780.
 17. BERNHARD, S., FLEURY, C., SU, Y. C., ZIPFEL, P. F., KOSKE, I., NORDSTROM, T. and RIESBECK, K. 2014. Outer membrane protein OlpA contributes to *Moraxella catarrhalis* serum resistance via interaction with factor H and the alternative pathway. *J Infect Dis*, 210, 1306-10.
 18. BHARTI, A., NALLY, J., RICALDI, J., MATTHIAS, M., DIAZ, M., LOVETT, M., LEVETT, GILMAN, R., WILLIG, M., GOTUZZO, E. and VINETZ, J. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*, 3, 757-71.
 19. BLOM, A. M., RYTKONEN, A., VASQUEZ, P., LINDAHL, G., DAHLBACK, B. and JONSSON, A. B. 2001. A Novel Interaction Between Type IV Pili of *Neisseria gonorrhoeae* and the Human Complement Regulator C4b-Binding Protein. *The Journal of Immunology*, 166, 6764-6770.
 20. BROOIMANS, R. A., VAN DER ARK, A. A. J., BUURMAN, W. A., VAN ES, L. A. and DAHA, M. R. 1990. Differential Regulation Of Complement Factor H And C3 Production In Human Umbilical Vein Endothelial Cells By IFN- γ And IL-1. *The Journal of Immunology*, 144, 3835-3840.
 21. CARLETON, O., CHARON, N., ALLENDER, P. and O'BRIEN, S. 1979. Helix Handedness of *Leptospira interrogans* as Determined by Scanning Electron Microscopy. *Journal of Bacteriology*, 137, 1413-1416.
 22. CARRENO, M. P., LABARRE, D., MAILLET, F., JOZEFOWICZ, M. and KAZATCHKINE, M. O. 1989. Regulation of the human alternative complement pathway: formation of a ternary complex between factor H, surface-bound C3b and chemical groups on nonactivating surfaces. *eur J Immunol*, 19, 2145-2150.
 23. CARVALHO, E., BARBOSA, A. S., GOMEZ, R. M., OLIVEIRA, M. L., ROMERO, E. C., GONCALES, A. P., MORAIS, Z. M., VASCONCELLOS, S. A. and HO, P. L. 2010. Evaluation of the expression and protective potential of Leptospiral sphingomyelinases. *Curr Microbiol*, 60, 134-42.
 24. CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M., FRAGA, T. R., SILVA, L. B., MONARIS, D., ABREU, P. A., STROBEL, S., JOZSI, M., ISAAC, L. and

- BARBOSA, A. S. 2012. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. *J Infect Dis*, 205, 995-1004.
25. CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M., FRAGA, T. R., BREDA, L. C., VASCONCELLOS, S. A., FIGUEIRA, C. P., PICARDEAU, M., WUNDER, E., KO, A. I., BARBOSA, A. S. and ISAAC, L. 2016. Acquisition of negative complement regulators by the saprophyte *Leptospira biflexa* expressing LigA or LigB confers enhanced survival in human serum. *Immunol Lett*.
 26. CASTIBLANCO-VALENCIA MM, FRAGA TR, PAGOTTO AH, SERRANO SM, ABREU PA, BARBOSA AS, and ISAAC, L. Plasmin cleaves fibrinogen and the human complement proteins C3b and C5 in the presence of *Leptospira interrogans* proteins: A new role of LigA and LigB in invasion and complement immune evasion. *Immunobiology* (2016) 221(5):679-89. doi: 10.1016/j.imbio.2016.01.001. PubMed PMID: 26822552.
 27. CEDIEL, N. y VILLAMIL, L. 2004. Riesgo Biológico Ocupacional en la Medicina Veterinaria, Área de Intervención Prioritaria. *Rev. Salud Pública*, 6, 28-43.
 28. CINCO, M., VECILE, E., MURGIA, R., DOBRINA, P. and DOBRINA, A. 1996. *Leptospira interrogans* and *Leptospira peptidoglycanes* induce the release of tumor necrosis factor α from human monocytes. *FEMS Microbiol Lett*, 211-214.
 29. COLOMBO, M. J. and ALUGUPALLI, K. R. 2008. Complement Factor H-Binding Protein, a Putative Virulence Determinant of *Borrelia hermsii*, Is an Antigenic Target for Protective B1b Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 180, 4858-4864.
 30. CHEN, M., FORRESTER, J. V. and XU, H. 2007. Synthesis of complement factor H by retinal pigment epithelial cells is down-regulated by oxidized photoreceptor outer segments. *Exp Eye Res*, 84, 635-45.
 31. CHING, A. T., FAVARO, R. D., LIMA, S. S., CHAVES ADE, A., DE LIMA, M. A., NADER, H. B., ABREU, P. A. and HO, P. L. 2012. *Leptospira interrogans* shotgun phage display identified LigB as a heparin-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 427, 774-9.
 32. CHOY, H. A. 2012. Multiple activities of LigB potentiate virulence of *Leptospira interrogans*: inhibition of alternative and classical pathways of complement. *PLoS One*, 7, e41566.
 33. CHOY, H. A., KELLEY, M. M., CHEN, T. L., MOLLER, A. K., MATSUNAGA, J. and HAAKE, D. A. 2007. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect Immun*, 75, 2441-50.
 34. DA SILVA, L. B., MIRAGAIA LDOS, S., BREDA, L. C., ABE, C. M., SCHMIDT, M. C., MORO, A. M., MONARIS, D., CONDE, J. N., JOZSI, M., ISAAC, L., ABREU, P. A. and BARBOSA, A. S. 2015. Pathogenic *Leptospira* species acquire factor H and vitronectin via the surface protein LcpA. *Infect Immun*, 83, 888-97.

35. DE CORDOBA, S. R. and DE JORGE, E. G. 2008. Translational mini-review series on complement factor H: genetics and disease associations of human complement factor H. *Clin Exp Immunol*, 151, 1-13.
36. DE PAULA, P., BARBOSA, J., JUNIOR, P., FERRIANI, V., LATORRE, M., NUDELMAN, V. and ISAAC, L. 2003. Ontogeny of Complement Regulatory Proteins – Concentrations of Factor H, Factor I, C4b-Binding Protein, Properdin and Vitronectin in Healthy Children of Different Ages and in Adults. *Scandinavian Journal of Immunology*, 58, 572-577.
37. DE SOUZA, L. and KOURY, M. 1992. Isolation and biological activities of endotoxin from *Leptospira interrogans*. *Can. J. Microbiol.*, 38, 284-9.
38. DEL CARLO BERNARDI, F., CTENAS, B., DA SILVA, L. F., NICODEMO, A. C., SALDIVA, P. H., DOLHNIKOFF, M. y MAUAD, T. 2012. Immune receptors and adhesion molecules in human pulmonary leptospirosis. *Hum Pathol*, 43, 1601-10.
39. DESAI, S., VAN TREECK, U., LIERZ, M., ESPELAGE, W., ZOTA, L., SARBU, A., CZERWINSKI, M., SADKOWSKA-TODYS, M., AVDICOVA, M., REETZ, J., LUGE, E., GUERRA, B., NOCKLER, K. and JANSEN, A. 2009. Resurgence of field fever in a temperate country: an epidemic of leptospirosis among seasonal strawberry harvesters in Germany in 2007. *Clin Infect Dis*, 48, 691-7.
40. DIAMENT, D., M., B., ROMERO, E. C., KALLAS, E. and SALOMAO, R. 2002. Peripheral Blood Mononuclear Cell Activation Induced by *Leptospira interrogans* Glycolipoprotein. *Infection and Immunity*, 70, 1677-1683.
41. DÍAZ, L., ZAPATA, I., GÓNGORA, A., PARRA, J., APONTE, L. y GÓMEZ, L. 2008. Detección de anticuerpo IgM a *Leptospira* en humanos en riesgo ocupacional en Villavicencio, Meta. *Rev. MVZ Córdoba*, 13, 1120-1127.
42. DOMINGOS, R. F., FERNANDES, L. G., ROMERO, E. C., DE MORAIS, Z. M., VASCONCELLOS, S. A. and NASCIMENTO, A. L. 2015. Novel *Leptospira interrogans* protein Lsa32 is expressed during infection and binds laminin and plasminogen. *Microbiology*, 161, 851-64.
43. DOMINGOS, R. F., VIEIRA, M., E.C., R., GONÇALES, A., DE MORAIS, Z. M., VASCONCELLOS, S. A. and NASCIMENTO, A. L. 2012. Features of two proteins of *Leptospira interrogans* with potential role in host-pathogen interactions. *BMC Microbiology*, 12, 1471-2180.
44. DONG, H., HU, Y., XUE, F., SUN, D., OJCIUS, D. M., MAO, Y. and YAN, J. 2008. Characterization of the ompL1 gene of pathogenic *Leptospira* species in China and cross-immunogenicity of the OmpL1 protein. *BMC Microbiol*, 8, 223.
45. DUNKELBERGER, J. R. and SONG, W. C. 2010. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*, 20, 34-50.
46. ENDO, Y., TAKAHASHI, M. and FUJITA, T. 2006. Lectin complement system and pattern recognition. *Immunobiology*, 211, 283-93.
47. ESPARZA-GORDILLO, J., SORIA, J. M., BUIL, A., ALMASY, L., BLANGERO, J., FONTCUBERTA, J. and RODRIGUEZ DE CORDOBA,

- S. 2004. Genetic and environmental factors influencing the human factor H plasma levels. *Immunogenetics*, 56, 77-82.
48. FEARON, D. T. and AUSTEN, K. F. 1975. Properdin: Binding To C3b And Stabilization Of The C3b-Dependent C3 Convertase. *The Journal Of Experimental Medicine*, 142, 856-863.
49. FERREIRA, V. P., PANGBURN, M. K. and CORTES, C. 2010. Complement control protein factor H: the good, the bad, and the inadequate. *Mol Immunol*, 47, 2187-97.
50. FINE, L. M., MILLER, D. P., MALLORY, K. L., TEGELS, B. K., EARNHART, C. G. and MARCONI, R. T. 2014. The *Borrelia hermsii* factor H binding protein FhbA is not required for infectivity in mice or for resistance to human complement in vitro. *Infect Immun*, 82, 3324-32.
51. FLEURY, C., SU, Y. C., HALLSTROM, T., SANDBLAD, L., ZIPFEL, P. F. and RIESBECK, K. 2014. Identification of a *Haemophilus influenzae* factor H-Binding lipoprotein involved in serum resistance. *J Immunol*, 192, 5913-23.
52. FORBES, A. E., ZOCHOWSKI, W. J., DUBREY, S. W. and SIVAPRAKASAM, V. 2012. Leptospirosis and Weil's disease in the UK. *QJM*, 105, 1151-62.
53. FRAGA, T. R., BARBOSA, A. S. and ISAAC, L. 2011. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scand J Immunol*, 73, 408-19.
54. FRAGA, T. R., COURROL-DOS SANTOS, S., CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M., HIRATA, I. Y., VASCONCELLOS, S. A., JULIANO, L., BARBOSA, A. S. and ISAAC, L. 2014. Immune evasion by pathogenic *Leptospira* strains: the secretion of proteases that directly cleave complement proteins. *J Infect Dis*, 209, 876-86.
55. FRIBERG, N., CARLSON, P., KENTALA, E., MATTILA, P. S., KUUSELA, P., MERI, S. and JARVA, H. 2008. Factor H Binding as a Complement Evasion Mechanism for an Anaerobic Pathogen, *Fusobacterium necrophorum*. *The Journal of Immunology*, 181, 8624-8632.
56. GAMBERINI, M., GOMEZ, R. M., ATZINGEN, M. V., MARTINS, E. A., VASCONCELLOS, S. A., ROMERO, E. C., LEITE, L. C., HO, P. L. and NASCIMENTO, A. L. 2005. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett*, 244, 305-13.
57. GAUDART, N., EKPO, P., PATTANAPANYASAT, K., VAN KOOYK, Y. and ENGERING, A. 2008. *Leptospira interrogans* is recognized through DC-SIGN and induces maturation and cytokine production by human dendritic cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 53, 359-67.
58. GORIS, M. G., WAGENAAR, J. F., HARTSKEERL, R. A., VAN GORP, E. C., SCHULLER, S., MONAHAN, A. M., NALLY, J. E., VAN DER POLL, T. and VAN 'T VEER, C. 2011. Potent innate immune response to pathogenic *Leptospira* in human whole blood. *PLoS One*, 6, e18279.

59. GOUVEIA, E., METCALFE, J., DE CARVALHO, A., AIRES, T., VILLASBOAS-BISNETO, J., QUEIRROZ, A., SANTOS, A., SALGADO, K., REIS, M. and KO, A. 2008. Leptospirosis associated Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome, Salvador, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 505-508.
60. GULATI, S., AGARWAL, S., VASUDHEV, S., RICE, P. A. and RAM, S. 2012. Properdin is critical for antibody-dependent bactericidal activity against *Neisseria gonorrhoeae* that recruit C4b-binding protein. *J Immunol*, 188, 3416-25.
61. HAAKE, D. A., MAZEL, M. K., MCCOY, A. M., MILWARD, F., CHAO, G., MATSUNAGA, J. & WAGAR, E. A. 1999. Leptospiral Outer Membrane Proteins OmpL1 and LipL41 Exhibit Synergistic Immunoprotection. *Infection and Immunity*, 67, 6572-6582.
62. HAAKE, D. A., CHAO, G., ZUERNER, R. L., BARNETT, J. K., BARNETT, D., MAZEL, M., MATSUNAGA, J., LEVETT, P. & BOLIN, C. A. 2000. The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 Is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection. *Infection and Immunity*, 68, 2276-2285.
63. HADDERS, M. A., BUBECK, D., ROVERSI, P., HAKOBYAN, S., FORNERIS, F., MORGAN, B. P., PANGBURN, M. K., LLORCA, O., LEA, S. M. and GROS, P. 2012. Assembly and regulation of the membrane attack complex based on structures of C5b6 and sC5b9. *Cell Rep*, 1, 200-7.
64. HALLSTROM, T., JARVA, H., RIESBECK, K. and BLOM, A. M. 2007. Interaction with C4b-Binding Protein Contributes to Nontypeable *Haemophilus influenzae* Serum Resistance. *The Journal of Immunology*, 178, 6359-6366.
65. HARBOE, M. and MOLLNES, T. E. 2008. The alternative complement pathway revisited. *J Cell Mol Med*, 12, 1074-84.
66. HAUKE, P., MACEDO, F., ROMERO, E. C., VASCONCELLOS, S. A., DE MORAIS, Z. M., BARBOSA, A. S. and HO, P. L. 2008. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. *Infect Immun*, 76, 2642-50.
67. HAUKE, P., GUZZO, C. R., ROMAN RAMOS, H., HO, P. L. & FARAH, C. S. 2009. Structure and calcium-binding activity of LipL32, the major surface antigen of pathogenic *Leptospira* sp. *J Mol Biol*, 390, 722-36.
68. HO, D. K., JARVA, H. and MERI, S. 2010. Human complement factor H binds to outer membrane protein Rck of Salmonella. *J Immunol*, 185, 1763-9.
69. HO, D. K., RIVA, R., KIRJAVAINEN, V., JARVA, H., GINSTROM, E., BLOM, A. M., SKURNIK, M. and MERI, S. 2012a. Functional recruitment of the human complement inhibitor C4BP to *Yersinia pseudotuberculosis* outer membrane protein Ail. *J Immunol*, 188, 4450-9.

70. HO, D. K., RIVA, R., SKURNIK, M. and MERI, S. 2012b. The *Yersinia pseudotuberculosis* outer membrane protein Ail recruits the human complement regulatory protein factor H. *J Immunol*, 189, 3593-9.
71. HO, D. K., SKURNIK, M., BLOM, A. M. and MERI, S. 2014. *Yersinia pestis* Ail recruitment of C4b-binding protein leads to factor I-mediated inactivation of covalently and noncovalently bound C4b. *Eur J Immunol*, 44, 742-51.
72. HO, D. K., TISSARI, J., JARVINEN, H. M., BLOM, A. M., MERI, S. and JARVA, H. 2011. Functional recruitment of human complement inhibitor C4B-binding protein to outer membrane protein Rck of *Salmonella*. *PLoS One*, 6, e27546.
73. HOVIS, K. M., FREEDMAN, J. C., ZHANG, H., FORBES, J. L. and MARCONI, R. T. 2008. Identification of an antiparallel coiled-coil/loop domain required for ligand binding by the *Borrelia hermsii* FhbA protein: additional evidence for the role of FhbA in the host-pathogen interaction. *Infect Immun*, 76, 2113-22.
74. INZANA, T. J., BALYAN, R. and HOWARD, M. D. 2012. Decoration of *Histophilus somni* lipooligosaccharide with N-acetyl-5-neuraminic acid enhances bacterial binding of complement factor H and resistance to killing by serum and polymorphonuclear leukocytes. *Vet Microbiol*, 161, 113-21.
75. JANSSEN, B. J. and GROS, P. 2007. Structural insights into the central complement component C3. *Mol Immunol*, 44, 3-10.
76. JIANG, H., SIEGEL, J. and GEWURZ, H. 1991. Binding And Complement Activation By C-Reactive Protein Via The Collagen-Like Region Of C1q And Inhibition Of These Reactions By Monoclonal Antibodies To C-Reactive Protein And C1q'. *The Journal of Immunology*, 164, 2324-2330.
77. JOINER, K. A., BROWN, E. J. and FRANK, M. M. 1984. COMPLEMENT AND BACTERIA: Chemistry and Biology in Host Defense. *Ann. Rev. Immunol.*, 2, 461-491.
78. JOZSI, M. and ZIPFEL, P. F. 2008. Factor H family proteins and human diseases. *Trends Immunol*, 29, 380-7.
79. KAZATCHKINE, M. O., FEARON, D. T., SILBERT, J. E. and AUSTEN, K. F. 1979. Surface-Associated Heparin Inhibits Zymosan-Induced Activation of The Human Alternative Complement Pathway By Augmenting The Regulatory Action Of The Control Proteins On Particle-Bound C3b. *J. Exp. Med.*, 150, 1202-1215.
80. KENEDY, M. R., VUPPALA, S. R., SIEGEL, C., KRAICZY, P. and AKINS, D. R. 2009. CspA-mediated binding of human factor H inhibits complement deposition and confers serum resistance in *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun*, 77, 2773-82.
81. KING, A. M., BARTPHO, T., SERMSWAN, R. W., BULACH, D. M., ESHGHI, A., PICARDEAU, M., ADLER, B. & MURRAY, G. L. 2013. Leptospiral outer membrane protein LipL41 is not essential for acute

- leptospirosis but requires a small chaperone protein, lep, for stable expression. *Infect Immun*, 81, 2768-76.
82. KIRJAVAINEN, V., JARVA, H., BIEDZKA-SAREK, M., BLOM, A. M., SKURNIK, M. and MERI, S. 2008. *Yersinia enterocolitica* serum resistance proteins YadA and ail bind the complement regulator C4b-binding protein. *PLoS Pathog*, 4, e1000140.
 83. KISHORE, U. and REID, K. B. M. 2000. C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacology*, 49, 159-170.
 84. KINDT TJ, GOLDSBY RA, OSBORNE BA. 7. Sistema del complemento. *Inmunología de Kuby*. McGraw-Hill (2007). p. 168-88.
 85. KISOVA-VARGOVA, L., CERNANSKA, D. and BHIDE, M. 2012. Comparative study of binding of ovine complement factor H with different *Borrelia* genospecies. *Folia Microbiol (Praha)*, 57, 123-8.
 86. KONAR, M., GRANOFF, D. M. and BEERNINK, P. T. 2013. Importance of inhibition of binding of complement factor H for serum bactericidal antibody responses to meningococcal factor H-binding protein vaccines. *J Infect Dis*, 208, 627-36.
 87. KREIZINGER, Z., BHIDE, M., BENCUROVA, E., DOLINSKA, S. and GYURANECZ, M. 2015. Complement sensitivity and factor H binding of European *Francisella tularensis* ssp. holarctica strains in selected animal species. *Acta Vet Hung*, 63, 275-84.
 88. LANGEREIS, J. D., DE JONGE, M. I. and WEISER, J. N. 2014. Binding of human factor H to outer membrane protein P5 of non-typeable *Haemophilus influenzae* contributes to complement resistance. *Mol Microbiol*, 94, 89-106.
 89. LEMEE, L., HONG, E., ETIENNE, M., DEGDMANE, A. E., DELBOS, V., TERRADE, A., BERTHELOT, G., CARON, F. and TAHA, M. K. 2014. Genetic Diversity and Levels of Expression of Factor H Binding Protein among Carriage Isolates of *Neisseria meningitidis*. *PLoS One*, 9, e107240.
 90. LEVETT, P. 2004. Leptospirosis: A forgotten zoonosis? *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 435-448.
 91. LEWIS, L. A., SHAFER, W. M., RAY, T. D., RAM, S. and RICE, P. A. 2013. Phosphoethanolamine Residues on the Lipid A Moiety of *Neisseria gonorrhoeae* Lipooligosaccharide Modulate Binding of Complement Inhibitors and Resistance to Complement Killing. *Infection and Immunity*, 81, 33-42.
 92. LICHT, C., PLUTHERO, F. G., LI, L., CHRISTENSEN, H., HABBIG, S., HOPPE, B., GEARY, D. F., ZIPFEL, P. D. and KAHR, W. 2009. Platelet-associated complement factor H in healthy persons and patients with atypical HUS. *Blood*, 114, 4538-4545.
 93. LIN, Y. P. and CHANG, Y. F. 2007. A domain of the *Leptospira* LigB contributes to high affinity binding of fibronectin. *Biochem Biophys Res Commun*, 362, 443-8.

94. LIN, M. H., CHANG, Y. C., HSIAO, C. D., HUANG, S. H., WANG, M. S., KO, Y. C., YANG, C. W. & SUN, Y. J. 2013. LipL41, a hemin binding protein from *Leptospira santarosai* serovar Shermani. *PLoS One*, 8, e83246.
95. LISZEWSKI, M. K., FARRIES, T. C., LUBLIN, D. M., ROONEY, I. A. and ATKINSON, J. P. 1996. Control of the Complement System. 61, 201-283.
96. MADAR, M., BENCUROVA, E., MLYNARCIK, P., ALMEIDA, A. M., SOARES, R., Bhide, K., PULZOVA, L., KOVAC, A., COELHO, A. V. and Bhide, M. 2015. Exploitation of complement regulatory proteins by *Borrelia* and *Francisella*. *Mol Biosyst*, 11, 1684-95.
97. MALM, S., JUSKO, M., EICK, S., POTEPA, J., RIESBECK, K. and BLOM, A. M. 2012. Acquisition of complement inhibitor serine protease factor I and its cofactors C4b-binding protein and factor H by *Prevotella intermedia*. *PLoS One*, 7, e34852.
98. MARIYA, R., CHAUDHARY, P., KUMAR, A. A., THANGAPANDIAN, E., AMUTHA, R. & SRIVASTAVA, S. K. 2006. Evaluation of a recombinant LipL41 antigen of *Leptospira interrogans* serovar Canicola in ELISA for serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 29, 269-77.
99. MAROTTO, P., NASCIMENTO, C., ELUF-NETO, J., MAROTTO, M., ANDRADE, L., SZTAJNBOK, J. and SEGURO, A. 1999. Acute Lung Injury in Leptospirosis: Clinical and Laboratory Features, Outcome, and Factors Associated with Mortality. *Clinical Infectious Diseases*, 1561-3.
100. MAROUN, E., KUSHAWAHA, A., EL-CHARABATY, E., MOBARAKAI, N. and EL-SAYEGH, S. 2011. Fulminant Leptospirosis (Weil's disease) in an urban setting as an overlooked cause of multiorgan failure: a case report. *J Med Case Rep*, 5, 7.
101. MARUVADA, R., BLOM, A. M. and PRASADARAO, N. V. 2008. Effects of complement regulators bound to *Escherichia coli* K1 and Group B *Streptococcus* on the interaction with host cells. *Immunology*, 124, 265-76.
102. MASTELLOS, D. and LAMBRIS, J. D. 2002. Complement: more than a 'guard' against invading pathogens? *Trends Immunol*, 23, 485-491.
103. MATSUNAGA, J., BAROCCHI, M. A., CRODA, J., YOUNG, T. A., SANCHEZ, Y., SIQUEIRA, I., BOLIN, C. A., REIS, M. G., RILEY, L. W., HAAKE, D. A. and KO, A. I. 2003. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Molecular Microbiology*, 49, 929-946.
104. MATSUNAGA, J., SANCHEZ, Y., XU, X. & HAAKE, D. A. 2005. Osmolarity, a key environmental signal controlling expression of leptospiral proteins LigA and LigB and the extracellular release of LigA. *Infect Immun*, 73, 70-8.
105. MATSUSHITA, M. and FUJITA, T. 1992. Activation of the Classical Complement Pathway by Mannose-binding Protein in Association with a Novel C1s-like Serine Protease. *J. Exp. Med.*, 176, 1497-1502.

106. MATSUSHITA, M. and FUJITA, T. 1995. Cleavage of the Third Component of Complement (C3) by Mannose-Binding Protein-Associated Serine Protease (MASP) with Subsequent Complement Activation. *Immunobiology*, 194, 443-448.
107. MATSUSHITA, M., KURAYA, M., HAMASAKI, N., TSUJIMURA, M., SHIRAKI, H. and FUJITA, T. 2002. Activation of the Lectin Complement Pathway by H-Ficolin (Hakata Antigen). *The Journal of Immunology*, 168, 3502-3506.
108. MATSUSHITA, M., THIEL, S., JENSENIUS, J. C., TERAJ, I. and FUJITA, T. 2000. Proteolytic Activities of Two Types of Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease. *The Journal of Immunology*, 165, 2637-2642.
109. MCDOWELL, J. V., LANKFORD, J., STAMM, L., SADLON, T., GORDON, D. L. and MARCONI, R. T. 2005. Demonstration of factor H-like protein 1 binding to *Treponema denticola*, a pathogen associated with periodontal disease in humans. *Infect Immun*, 73, 7126-32.
110. MCMULLEN, M. E., HART, M. L., WALSH, M. C., BURAS, J., TAKAHASHI, K. and STAHL, G. L. 2006. Mannose-binding lectin binds IgM to activate the lectin complement pathway in vitro and in vivo. *Immunobiology*, 211, 759-66.
111. MEDZHITOV, R. and JANEWAY JR, C. 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*, 173, 89-97.
112. MERIEN, F., TRUCCOLO, J., BARANTON, G. and PEROLAT, P. 2000. Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. *FEMS Microbiol Lett*, 185, 17-22.
113. MILLER, D. P., BELL, J. K., MCDOWELL, J. V., CONRAD, D. H., BURGNER, J. W., HEROUX, A. and MARCONI, R. T. 2012. Structure of factor H-binding protein B (FhbB) of the periopathogen, *Treponema denticola*: insights into progression of periodontal disease. *J Biol Chem*, 287, 12715-22.
114. MILLER, D. P., MCDOWELL, J. V., BELL, J. K. and MARCONI, R. T. 2011. Crystallization of the factor H-binding protein, FhbB, from the periopathogen *Treponema denticola*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 67, 678-81.
115. MILLER, D. P., MCDOWELL, J. V., RHODES, D. V., ALLARD, A., CAIMANO, M., BELL, J. K. and MARCONI, R. T. 2013. Sequence divergence in the *Treponema denticola* FhbB protein and its impact on factor H binding. *Mol Oral Microbiol*, 28, 316-30.
116. MÜLLER-EBERHARD, H. J. 1985. The Killer Molecule of Complement. *Journal of Investigative Dermatology*, 85, 47-52.
117. NATARAJASEENIVASAN, K., BOOPALAN, M., SELVANAYAKI, K., RAJA-SURESH, S. and RATNAM, S. 2002. Leptospirosis among Rice Mill Workers of Salem, South India *Jpn. J. Infect. Dis*, 55, 170-173.
118. NAUTA, A. J., TROUW, L. A., DAHA, M. R., TIJSMA, O., NIEUWLAND, R., SCHWAEBLE, W. J., GINGRAS, A. R., MANTOVANI, A., E.C.; H. and

- ROOS, A. 2002. Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. *Eur J Immunol*, 32, 1726-1736.
119. NGAMPASUTADOL, J., RAM, S., BLOM, A. M., JARVA, H., JERSE, A. E., LIEN, E., GOGUEN, J., GULATI, S. and RICE, P. A. 2005. Human C4b-binding protein selectively interacts with *Neisseria gonorrhoeae* and results in species-specific infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 17142-7.
120. NGAMPASUTADOL, J., RAM, S., GULATI, S., AGARWAL, S., LI, C., VISINTIN, A., MONKS, B., MADICO, G. and RICE, P. A. 2008. Human Factor H Interacts Selectively with *Neisseria gonorrhoeae* and Results in Species-Specific Complement Evasion. *The Journal of Immunology*, 180, 3426-3435.
121. NORDSTROM, T., BLOM, A. M., FORSGREN, A. and RIESBECK, K. 2004. The Emerging Pathogen *Moraxella catarrhalis* Interacts with Complement Inhibitor C4b Binding Protein through Ubiquitous Surface Proteins A1 and A2. *The Journal of Immunology*, 173, 4598-4606.
122. PANGBURN, M. K. 1987. A fluorimetric assay for native C3: The hemolytically active form of the third component of human complement. *Journal of Immunological Methods*, 102, 7-14.
123. PANGBURN, M. K. and MÜLLER-EBERHARD, H. J. 1980. Relation of A Putative Thioester Bond in C3 To Activation Of The Alternative Pathway And The Binding Of C3b To Biological Targets Of Complement. *J. Exp. Med.*, 152, 1102-1114.
124. PANGBURN, M. K. and MÜLLER-EBERHARD, H. J. 1984. The Alternative Pathway of Complement. *Springer Semin Immunopathol*, 7, 163-192.
125. PANGBURN, M. K., RAWAL, N., CORTES, C., ALAM, M. N., FERREIRA, V. P. and ATKINSON, M. A. L. 2009. Polyanion-Induced Self-Association of Complement Factor H. *The Journal of Immunology*, 182, 1061-1068.
126. PAPPAS, C. J. & PICARDEAU, M. 2015. Control of Gene Expression in *Leptospira* spp. by Transcription Activator-Like Effectors Demonstrates a Potential Role for LigA and LigB in *Leptospira interrogans* Virulence. *Appl Environ Microbiol*, 81, 7888-92.
127. PICARDEAU, M. 2013. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Medecine Et Maladies Infectieuses*, 43, 1-9.
128. PICARDEAU, M., BRENOT, A. and SAINT GIRONS, I. 2001. First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa* flaB results in non-motile mutants deficient in endoflagella. *Molecular Microbiology*, 40, 189-199.
129. PINNE, M. & HAAKE, D. A. 2013. LipL32 Is a Subsurface Lipoprotein of *Leptospira interrogans*: presentation of new data and reevaluation of previous studies. *PLoS One*, 8, e51025.
130. PLANK, R. and DEAN, D. 2000. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes and Infection*, 1265-1276.

131. POLLE, F., STOREY, E., EADES, S., ALT, D., HORNSBY, R., ZUERNER, R. and CARTER, R. 2014. Role of intraocular *Leptospira* infections in the pathogenesis of Equine Recurrent Uveitis in the Southern United States. *Journal of Equine Veterinary Science*.
132. POTEPA, M., POTEPA, J., OKROJ, M., POPADIAK, K., EICK, S., NGUYEN, K., RIESBECK, K. and BLOM, A. M. 2008. Binding of complement inhibitor C4b-binding protein contributes to serum resistance of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Immunol*, 181, 5537-5544.
133. PRASADARAO, N. V., BLOM, A. M., VILLOUTREIX, B. O. and LINSANGAN, L. C. 2002. A Novel Interaction of Outer Membrane Protein A with C4b Binding Protein Mediates Serum Resistance of *Escherichia coli* K1. *The Journal of Immunology*, 169, 6352-6360.
134. PRESCOTT, J., MILLER, R., NICHOLSON, V., MARTIN, S. and LESNICK, T. 1987. Seroprevalence and Association with Abortion of Leptospirosis in Cattle in Ontario. *Can. J. Vet. Res*, 52, 210-215.
135. RAGHAVAN, R. K., BRENNER, K. M., HIGGINS, J. J., HUTCHINSON, J. M. and HARKIN, K. R. 2012. Evaluations of hydrologic risk factors for canine leptospirosis: 94 cases (2002-2009). *Prev Vet Med*, 107, 105-9.
136. RAM, S., CULLINANE, M., BLOM, A. M., GULATI, S., MCQUILLEN, D. P., MONKS, B. G., O'CONNELL, C., BODEN, R., ELKINS, C., PANGBURN, M. K., DAHLBÄCK, B. and RICE, P. A. 2001. Binding of C4b-binding Protein to Porin: A Molecular Mechanism of Serum Resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Exp. Med.*, 193, 281-295.
137. RAM, S., SHARMA, A. K., SIMPSON, S. D., GULATI, S., MCQUILLEN, D. P., PANGBURN, M. K. and RICE, P. A. 1998. A Novel Sialic Acid Binding Site on Factor H Mediates Serum Resistance of Sialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Exp. Med.*, 187, 743-752.
138. RICKLIN, D., HAJISHENGALLIS, G., YANG, K. and LAMBRIS, J. D. 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*, 11, 785-97.
139. RIPOCHE, J., DAY, A., HARRIS, T. and SIM, R. 1988. The complete amino acid sequence of human complement factor H. *Biochem. J.*, 1988, 593-602.
140. RISTOW, P., BOURHY, P., DA CRUZ MCBRIDE, F. W., FIGUEIRA, C. P., HUERRE, M., AVE, P., GIRONS, I. S., KO, A. I. and PICARDEAU, M. 2007. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathog*, 3, e97.
141. RODRIGUEZ DE CORDOBA, S., ESPARZA-GORDILLO, J., GOICOECHEA DE JORGE, E., LOPEZ-TRASCASA, M. and SANCHEZ-CORRAL, P. 2004. The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol Immunol*, 41, 355-67.
142. ROGGENKAMP, A., RUCKDESCHL, K., LEITRITZ, L., SCHMITT, R. and HEESEMANN, J. 1996. Deletion of Amino Acids 29 to 81 in Adhesion Protein YadA of *Yersinia enterocolitica* Serotype O:8 Results in Selective Abrogation of Adherence to Neutrophils. *Infection and Immunity*, 64.

143. SAKAUE, T., TAKEUCHI, K., MAEDA, T., YAMAMOTO, Y., NISHI, K. and OHKUBO, I. 2010. Factor H in porcine seminal plasma protects sperm against complement attack in genital tracts. *J Biol Chem*, 285, 2184-92.
144. SANDERS, E., RIGAU-PÉREZ, J., SMITS, H., DESEDA, C., VORNDAM, V., AYE, T., SPIEGEL, R., WEYANT, R. and BRAGG, S. 1999. Increase Of Leptospirosis In Dengue-Negative Patients After A Hurricane In Puerto Rico In 1966. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61, 399-404.
145. SCANZIANI, E., LUINI, M., FABBI, M. and PIZZOCARO, P. 1992. Comparison between specific immunoperoxidase staining and bacteriological culture in the diagnosis of renal leptospirosis of pigs. *Research in Veterinary Science*, 50, 229-232.
146. SCHINDLER, M. K., SCHUTZ, M. S., MUHLENKAMP, M. C., ROOIJAKKERS, S. H., HALLSTROM, T., ZIPFEL, P. F. and AUTENRIETH, I. B. 2012. Yersinia enterocolitica YadA mediates complement evasion by recruitment and inactivation of C3 products. *J Immunol*, 189, 4900-8.
147. SCHOTT, M., GROSSKINSKY, S., BRENNER, C., KRAICZY, P. and WALLICH, R. 2010. Molecular characterization of the interaction of *Borrelia parkeri* and *Borrelia turicatae* with human complement regulators. *Infect Immun*, 78, 2199-208.
148. SCHWAEBLE, W., ZWIRNER, J., SCHULZ, T. F., LINKE, R. P., DIERICH, M. P. and WEISS, E. 1987. Human complement factor H: expression of an additional truncated gene product of 43 kDa in human liver. *eur J Immunol*, 17, 1485-1489.
149. SEGERS, R., VAN GESTEL, J., VAN EYS, G., VAN DER ZEIJST, B. and GAASTRA, W. 1992. Presence of Putative Sphingomyelinase Genes among Members of the Family Leptospiraceae. *Infection and Immunity*, 60, 1707-1710.
150. SEPÚLVEDA, A., SANTIAGO, J. and PRECIADO, F. 2002. La rata y el perro, importantes vectores de la leptospirosis en explotaciones pecuarias de Cd. Guzmán, Jalisco. *Rev. Cubana. Med. Trop.*, 54, 21-3.
151. SHANG, E. S., SUMMERS, T. A. & HAAKE, D. A. 1996. Molecular Cloning and Sequence Analysis of the Gene Encoding LipL41, a Surface-Exposed Lipoprotein of Pathogenic Leptospira Species. *Infection and Immunity*, 64, 2322-2330.
152. SHAUGHNESSY, J., LEWIS, L. A., JARVA, H. and RAM, S. 2009. Functional comparison of the binding of factor H short consensus repeat 6 (SCR 6) to factor H binding protein from *Neisseria meningitidis* and the binding of factor H SCR 18 to 20 to *Neisseria gonorrhoeae* porin. *Infect Immun*, 77, 2094-103.
153. SHAUGHNESSY, J., RAM, S., BHATTACHARJEE, A., PEDROSA, J., TRAN, C., HORVATH, G., MONKS, B., VISINTIN, A., JOKIRANTA, T. S. and RICE, P. A. 2011. Molecular characterization of the interaction between sialylated *Neisseria gonorrhoeae* and factor H. *J Biol Chem*, 286, 22235-42.

154. SHIMIZU, T., MATSUSAKA, E., TAKAYANAGI, K., MASUZAWA, T., IWAMOTO, Y., MORITA, T., MIFUCHI, I. and YANAGIHARA, Y. 1987. Biological activities of Lipopolysaccharide-Like Substance (LLS) Extracted from *Leptospira interrogans* Serovar Canicola Strain Moulton. *Microbiol. Immunol.*, 31, 727-735.
155. SIQUEIRA, G. H., ATZINGEN, M. V., ALVES, I. J., DE MORAIS, Z. M., VASCONCELLOS, S. A. and NASCIMENTO, A. L. 2013. Characterization of three novel adhesins of *Leptospira interrogans*. *Am J Trop Med Hyg*, 89, 1103-16.
156. SOUZA, N. M., VIEIRA, M. L., ALVES, I. J., DE MORAIS, Z. M., VASCONCELLOS, S. A. and NASCIMENTO, A. 2012. Lsa30, a novel adhesin of *Leptospira interrogans* binds human plasminogen and the complement regulator C4bp. *Microbial Pathogenesis*, 53, 125-134.
157. STEVENSON, B., CHOY, H. A., PINNE, M., ROTONDI, M. L., MILLER, M. C., DEMOLL, E., KRAICZY, P., COOLEY, A. E., CREAMER, T. P., SUCHARD, M. A., BRISSETTE, C. A., VERMA, A. and HAAKE, D. A. 2007. *Leptospira interrogans* Endostatin-Like Outer Membrane Proteins Bind Host Fibronectin, Laminin and Regulators of Complement. *Plos One*, 2, 11.
158. TAKAHASHI, M., IWAKI, D., KANNO, K., ISHIDA, Y., XIONG, J., MATSUSHITA, M., ENDO, Y., MIURA, S., ISHII, N., SUGAMURA, K. and FUJITA, T. 2008. Mannose-Binding Lectin (MBL)-Associated Serine Protease (MASP)-1 Contributes to Activation of the Lectin Complement Pathway. *The Journal of Immunology*, 180, 6132-6138.
159. TAN, L. A., YANG, A. C., KISHORE, U. and SIM, R. B. 2011. Interactions of complement proteins C1q and factor H with lipid A and Escherichia coli: further evidence that factor H regulates the classical complement pathway. *Protein Cell*, 2, 320-32.
160. TU, Z., LI, Q., BU, H. and LIN, F. 2010. Mesenchymal stem cells inhibit complement activation by secreting factor H. *Stem Cells Dev*, 19, 1803-9.
161. VADO-SOLÍS, I., CÁRDENAS-MARRUFO M, PÉREZ-OSORIO C, JIMÉNEZ-DELGADILLO B, ARIAS-LEÓN J y G, P.-L. 2014. Leptospirosis: una enfermedad ocupacional en trabajadores que conviven con bovinos seropositivos en el estado de Yucatán. *Ciencia y Humanismo en la Salud*, 1, 4-13.
162. VERMA, A., BRISSETTE, C. A., BOWMAN, A. A., SHAH, S. T., ZIPFEL, P. F. and STEVENSON, B. 2010. Leptospiral endostatin-like protein A is a bacterial cell surface receptor for human plasminogen. *Infect Immun*, 78, 2053-9.
163. VERMA, A., STEVENSON, B. and ADLER, B. 2013. Leptospirosis in horses. *Vet Microbiol*, 167, 61-6.
164. VIEIRA, M. L., DE MORAIS, Z. M., GONCALES, A. P., ROMERO, E. C., VASCONCELLOS, S. A. and NASCIMENTO, A. L. 2010. Lsa63, a newly identified surface protein of *Leptospira interrogans* binds laminin and collagen IV. *J Infect*, 60, 52-64.

165. VIEIRA, M. L., DE MORAIS, Z. M., VASCONCELLOS, S. A., ROMERO, E. C. and NASCIMENTO, A. L. 2011. In vitro evidence for immune evasion activity by human plasmin associated to pathogenic *Leptospira interrogans*. *Microb Pathog*, 51, 360-5.
166. VIEIRA, M. L., FERNANDES, L. G., DOMINGOS, R. F., OLIVEIRA, R., SIQUEIRA, G. H., SOUZA, N. M., TEIXEIRA, A. R., ATZINGEN, M. V. and NASCIMENTO, A. L. 2014. Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen-host interactions. *FEMS Microbiol Lett*, 352, 129-39.
167. VIHN, T., ADLER, B. and FAINE, S. 1986. Glycolipoprotein Cytotoxin from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Journal Of General Microbiology*, 132, 111-123.
168. VIJAYACHARI, P., SUGUNAN, A. and SHRIRAM, N. 2008. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J. Biosci.*, 33, 557-569.
169. WALPORT, M. 2001. Complement. First of Two Parts. *N. eng. J. Med.*, 344, 1058-1066.
170. WANG, H., WU, Y., OJCIUS, D. M., YANG, X. F., ZHANG, C., DING, S., LIN, X. and YAN, J. 2012. Leptospiral hemolysins induce proinflammatory cytokines through Toll-like receptor 2-and 4-mediated JNK and NF-kappaB signaling pathways. *PLoS One*, 7, e42266.
171. WHALEY, K. and RUDDY, S. 1976. Modulation of the Alternative Complement Pathway by β 1h Globulin. *J. Exp. Med.*, 144, 1147-1163.
172. WELSCH, J. A. and RAM, S. 2008. Factor H and Neisserial pathogenesis. *Vaccine*, 26, I40-I45.
173. WOOSTER, D. G., MARUVADA, R., BLOM, A. M. and PRASADARAO, N. V. 2006. Logarithmic phase *Escherichia coli* K1 efficiently avoids serum killing by promoting C4bp-mediated C3b and C4b degradation. *Immunology*, 117, 482-93.
174. YANG, C. W. 2002. The *Leptospira* Outer Membrane Protein LipL32 Induces Tubulointerstitial Nephritis-Mediated Gene Expression in Mouse Proximal Tubule Cells. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13, 2037-2045.
175. ZALMAN, L. S. and MÜLLER-EBERHARD, H. J. 1990. Comparison Of Channels Formed By Poly C9, C5b-8 And The Membrane Attack Complex Of Complement. *Molecular Immunology*, 27, 533-537.
176. ZHANG, Y., GENG, Y., YANG, J., GUO, X. and ZHAO, G. 2007. Cytotoxic activity and probable apoptotic effect of Sph2, a sphigomyelinase hemolysin from *Leptospira interrogans* strain Lai. *BMB Reports*. BMB Reports.
177. ZIPFEL, P. F. and SKERKA, C. 2009. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol*, 9, 729-40.

Abreviaturas y siglas usadas

Å – Armstrong (Equivalente a 0.1 nm)

ANOVA – Análisis de varianza (Analysis Of Variance)

AP – Alto Pasaje

BP – Bajo Pasaje

C4BP – Proteína de Unión a C4 (C4 Binding Protein)

Ctrl - Control

ELISA – Inmunoensayo Ligado a Enzimas (Enzymatic Linked Immuno-Sorbent Assay)

EMJH (Medio) – Ellinghausen-McCullough modificado por Johnson-Harris

FH – Factor H

GriLLep – Grupo de Investigación en *Leptospira* y Leptospirosis

kDa - Kilodaltones

LSA – Adhesina de Superficie de *Leptospira* (Leptospiral Surface Adhesin)

MAC - Complejo de Ataque de Membrana (Membrane Attack Complex)

MBL - Lectina de Unión a Manosa (Mannose Binding Lectin)

min. - minuto

µl – Microlitro

nm - Nanómetro

OPD – O- Phenilenediamine

PBS – Solución Amortiguadora de Fosfatos (Phosphate Buffer Solution)

rpm – revoluciones por minuto

SHN – Suero Humano Normal

SHN – IC – Suero Humano Normal Inactivado por Calor (56°C 30 minutos)

Sv., svs. – Serovariedad, serovariedades

x g' – Gravedades

Anexos

Anexo 1.- Técnica de ELISA para determinación de captura de Factor H por parte de *Leptospira* spp. (Meri et al., 2005, Barbosa et al., 2009, Sahagún-Ruiz et al., 2014)

Preparación de la placa

1. Realizar conteo de *Leptospira* en cámara de Petroff-Hausser, diluyendo 50 μl de medio de cultivo en 950 μl de PBS, depositando 10 μl de la disolución y obteniendo el número de bacterias en el total del medio, ajustando el número a 2×10^8 (Se usará 1×10^8 por cada pozo)
2. Retirar el medio EMJH de las leptospiras, centrifugando a $11,600 \times g$ 20°C 10' y decantar el medio, cuidando de no remover la pastilla
3. Reconstituir con PBS y homogeneizar la pastilla con pipeteo. Tomar la cantidad necesaria de bacterias según el ajuste del medio de cultivo
4. **Incubar con 40% SHN, SCN ó SHN ó SC-IC 37°C 15' (Volumen final de 200 μl)**
 - a. Detener la reacción de C' en hielo a 1'
5. Lavar el pellet con PBS, centrifugar a $11,600 \times g$ 10' 10°C 3 veces
6. Resuspender 200 μl en 0.1 M NaHCO_3 pH 9.6 y depositar 100 μl en los pozos problema en placas de ELISA
7. **Incubar a 4°C durante toda la noche**
8. Lavar 3 veces usando 200 μl /pozo con PBS-T [PBS+0.05% Tween 20 (0.25 ml en 500 ml de PBS 1X)]
 - a. Bloquear con 200 μl por pozo de PBS-T+ BSA 3% 37°C 1-2h

Detección

1. Lavar 1 vez con PBS-T usando 200 μl /pozo
2. Diluir el anticuerpo anti-FH 1:5000 [8 $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$] (1 μl en 4999 μl de PBS. Para 20 ml usar 4 μl en 19996 μl) + 1% (0.2g) de BSA y aplicar 200 μl /pozo
 - a. **Incubar durante 1 hora a 37°C**

3. Lavar **3** veces con PBS-T usando 200 μ l/pozo
4. Diluir el anti-IgG de oveja 1:10, 000 [2μ g/ 1μ l] (2μ l en 19,998 μ l de PBS) + 1% (0.2g) de BSA y aplicar 200 μ l/ pozo
 - a. Incubar durante 1 hora a 37°C**
5. Lavar 3 veces con PBS-T usando 200 μ l/pozo

Revelado

1. Preparar la solución con 0.04% O-Phenilenediamine (0.008g), 0.015% H₂O₂ (3 μ l) c.b.p. 20 ml de buffer citrato-fosfato pH 5.0
2. Dejar reaccionar durante 20 minutos (estar al pendiente del viraje, cuidar que haya diferencias observables) y en cuanto vire detener la reacción con H₂SO₄ 4N 200 μ l/pozo (1.47ml H₂SO₄ cbp. 20 ml)

Leer a 492 nm en el lector de ELISA

Preparación de Soluciones para ELISA

Montaje en placa:

Buffer carbonato 100 mM

Carbonato de sodio anhidro \rightarrow Peso Molecular 105.99 (J.T. Baker).....10.599 g

Ajustar pH a 9.6

C.B.P. 500 ml

Revelado

Buffer Citrato Fosfato

Ácido Cítrico monohidratado, polvo (HOC(COOH)(CH₂COOH)₂H₂O

(J.T. Baker)2.6 g

Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na₂HPO₄) (AlyT Reactivos Analíticos)..... 6.9 g

Ajustar pH a 5.0

C.B.P. 500 ml

Paro de Reacción

Ácido sulfúrico 4N

Ácido Sulfúrico 95-98% H₂SO₄ (J.T. Baker)5.35 ml

C.B.P. 100 ml

Modo de preparación:

Agregar 30-40 ml de agua destilada en un vaso de precipitado. Agregar el ácido por goteo, tocar la pared del vaso de precipitado, al detectar calor detenerse un momento hasta que enfríe y continuar. Finalmente aforar a 100 ml en agitación constante.

OJO: Nunca adicione agua sobre un ácido concentrado. Para diluirlos, debe agregarse poco a poco al agua y agitar constantemente. Si no, el calor desprende el ácido y lo proyecta.

Anexo 2.- Técnica para determinación de sobrevivencia al Suero Humano Normal por *Leptospira* spp. (Meri et al., 2005, Barbosa et al., 2009)

1. Contar en la cámara de Petroff-Hausser y ajustar la solución a aproximadamente 5×10^6 bacterias
2. Centrifugar a $11,600 \times g$ 15' y retirar el medio de cultivo cuidadosamente usando punta de 200 μ l estéril, dejando solamente el pellet bacteriano
3. Incubar a 37°C durante 60 minutos con 40% SHN o SIC (56°C 30'), volumen final 200 μ l)
 - a. Homogeneizar bien el pellet en 60% PBS, agregar posteriormente el suero
 - b. Realizar incubación en agitación constante a 120 RPM
 - c. Detener actividad de C' \rightarrow incubar la suspensión en hielo 1'
4. Tomar 20 μ l de la suspensión y transferir a 180 μ l de EMJH modificado, previamente servido en placa de 96 pozos con tapa y tapar
5. Sellar alrededor con Parafilm®, incubar a 30°C durante 4 días
6. Observar en cámara de Petroff-Hausser diluyendo sólo si el número bacteriano no es fácil de contar. Para evaluar tomar como 100% los pozos incubados con SHN-IC.

Anexo 3.- Preparación de medio EMJH modificado (Barbosa *et. al.*,2009)

Para 500 ml

Medio base

Peptona (BD Bioxon).....	0.15 g
Extracto de carne (Opcional) (BD Bioxon).....	0.1 g
Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄) (AlyT Reactivos Analíticos).....	0.5 g
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄) (J.T. Baker).....	0.15 g
Cloruro de sodio (NaCl) (J.T. Baker).....	0.5 g
Cloruro de amonio (NH ₄ Cl) (J.T. Baker).....	0.125 g
Tiamina (J.T. Baker).....	0.0002 g
(500 µl solución 0.05g/10ml agua destilada previamente esterilizada en autoclave)	
Agua previamente esterilizada en autoclave: C.B.P. 450 ml	

Soluciones

L-asparagina (Sigma-Aldrich).....	2.5 ml
(0.18 g cbp 6ml H ₂ O destilada previamente esterilizada en autoclave)	
Solución de Cloruro de calcio y magnesio (J.T. Baker).....	0.5 ml
En 2 ml de H ₂ O destilada previamente esterilizada en autoclave agregar:	
0.0264g CaCl ₂ · 2H ₂ O	
0.0426 MgCl ₂ · 6H ₂ O	
Piruvato de sodio (J.T. Baker).....	0.5 ml
En 2 ml de H ₂ O destilada previamente esterilizada en autoclave agregar:	
0.02g CH ₃ COCOONa	
Suero de conejo inactivado a 56°C 30'.....	50 ml

Filtrar con prefiltro y con 0.45µm, finalmente con 0.22µm en gabinete de bioseguridad clase II. Servir en frasco, someter a prueba de esterilidad a 37°C 24h, colocar Parafilm® y almacenar a 4°C. Cada que se use el medio atemperar previamente (Puede usarse baño María a 37°C), abrir la botella en gabinete de bioseguridad clase II y servir la cantidad necesaria.

Anexo 4. Matriz de datos del experimento de Captura de Factor H de suero por *Leptospira* spp. de bajo y alto pasaje.

	LOCaS 46 BP		LOCaS 46 AP		LOVe 30 BP		LOVe 30 AP		MOCA 45 BP		MOCA 45 AP		Patoc I	PBS	SHN FH
0.134	0.6689	0.14	0.6846	0.176	0.8641	0.114	0.229	0.115	0.8819	0.144	0.7544	0.072	0.6162	0.055	1.5323
0.099	0.661	0.12	0.6415	0.147	0.944	0.116	0.2461	0.121	1.3542	0.154	0.6928	0.057	0.609	0.053	0.8605
0.125	0.9217	0.08	0.5211	0.104	1.1942	0.1	0.3748	0.112	1.2787	0.109	1.2029	0.097	0.6007	0.056	1.0745
0.094	0.9094	0.1	0.6434	0.115	1.0769	0.098	0.434	0.103	1.1613	0.126	1.1402	0.097	0.3832	0.059	0.807
0.115	0.8819	0.09	0.664	0.116	0.9706	0.07	0.2338	0.128	0.7723	0.126	0.8452	0.097	0.4109	0.054	1.6795
0.112	0.6749	0.1	0.7472	0.114	0.914	0.065	0.2249	0.154	1.1446	0.139	1.0206	0.097	0.3293	0.059	1.6611
												0.058	0.4106	0.056	
												0.056	0.3401	0.061	

Anexo 5. Matriz de datos de sobrevivencia al suero humano normal con serovariedades de bajo y alto pasaje

	LOCaS 46 BP		LOCaS 46 AP		LOVe 30 BP		LOVe 30 AP		MOCA 45 BP		MOCA 45 AP		Patoc I
5.2E+06	2.1E+06	2.5E+05	3.5E+05	3.8E+06	3.8E+06	3.7E+06	1.0E+05	1.2E+06	4.0E+05	3.5E+06	2.8E+06	5.1E+06	0.00E+00
5.6E+06	2.4E+06	1.3E+06	3.0E+05	3.4E+06	2.0E+06	2.2E+06	1.5E+05	1.3E+06	8.5E+05	3.1E+06	1.7E+06	4.6E+06	0.00E+00
5.9E+06	2.7E+06	1.6E+06	2.0E+05	5.7E+06	2.2E+06	1.7E+06	3.0E+05	1.6E+06	8.5E+05	3.4E+06	2.0E+06	4.3E+06	0.00E+00
1.9E+06	3.5E+05	5.2E+06	1.5E+06	2.6E+06	1.5E+06	3.5E+06	4.0E+05	1.7E+06	1.0E+06	1.5E+06	1.3E+06	3.2E+06	0.00E+00
2.1E+06	1.1E+06	2.6E+06	1.2E+06	3.0E+06	1.2E+06	4.0E+06	0.0E+00	1.3E+06	1.2E+06	1.4E+06	1.5E+06	3.3E+06	0.00E+00
2.0E+06	1.0E+06	7.2E+06	1.3E+06	2.3E+06	1.2E+06	2.1E+06	5.0E+04	1.5E+06	1.2E+06	1.4E+06	5.5E+05	4.0E+06	0.00E+00
1.6E+06	7.0E+05	9.0E+05	1.5E+05	5.0E+06	2.1E+06	7.0E+05	0.0E+00	1.9E+06	7.0E+05	1.4E+06	9.5E+05	1.8E+06	0.00E+00
1.6E+06	5.5E+05	5.0E+05	1.0E+05	1.7E+06	1.4E+06	1.2E+06	5.0E+04	1.7E+06	8.0E+05	1.7E+06	7.5E+05	3.8E+06	0.00E+00
1.3E+06	4.0E+05	7.0E+05	2.5E+05	1.9E+06	1.8E+06	9.5E+05	1.0E+05	1.7E+06	1.2E+06	1.5E+06	1.1E+06	3.5E+06	0.00E+00
		1.6E+06	2.0E+05	3.5E+06	1.5E+06	8.5E+05	5.0E+04	1.3E+06	1.3E+06	2.5E+06	2.2E+06	1.8E+06	0.00E+00
		1.6E+06	5.0E+05	3.4E+06	2.3E+06	6.0E+05	0.0E+00	1.3E+06	7.5E+05	3.2E+06	2.7E+06	2.3E+06	0.00E+00
		1.7E+06	5.5E+05	2.9E+06	2.0E+06	8.5E+05	0.0E+00	1.6E+06	1.1E+06	2.6E+06	1.6E+06	2.2E+06	0.00E+00

Anexo 6. Matriz de datos de Captura de Factor H por diez serovariedades de *Leptospira* spp. de alto pasaje

	Aut		Bat		Can		Gri		Hpj		Ict		Pom		Pyr		Tar		Wol	PBS	SHN FH
0.06	0.79	0.07	0.43	0.06	0.41	0.13	0.90	0.06	0.65	0.07	0.55	0.07	0.49	0.09	0.36	0.10	0.73	0.07	0.74	0.05	1.17
0.06	1.05	0.07	0.41	0.06	0.39	0.14	0.93	0.08	0.51	0.07	0.66	0.07	0.50	0.06	0.34	0.07	0.82	0.07	0.74	0.06	1.19
0.05	0.92	0.08	0.61	0.09	0.60	0.07	0.72	0.07	0.66	0.08	0.65	0.08	0.67	0.06	0.36	0.08	0.86	0.08	0.80	0.06	0.90
0.07	0.87	0.09	0.56	0.10	0.65	0.06	0.73	0.05	0.49	0.07	0.52	0.08	0.51	0.07	0.41	0.06	1.00	0.07	0.69	0.06	1.40
0.07	0.79	0.07	0.57	0.08	0.68	0.06	0.78	0.06	0.53	0.06	0.50	0.08	0.55	0.08	0.38	0.07	0.79	0.08	0.62	0.05	1.28
0.07	0.99	0.06	0.62	0.08	0.61	0.09	0.83	0.09	0.51	0.07	0.60	0.08	0.43	0.06	0.43	0.06	0.97	0.08	0.60	0.06	1.06
0.08	1.07	0.06	0.53	0.05	0.38	0.09	0.68	0.06	0.47	0.05	0.48	0.08	0.45	0.07	0.44	0.06	0.74			0.06	1.07
0.08	1.03	0.06	0.53	0.05	0.66			0.09	0.53	0.05	0.54	0.06	0.63	0.05	0.54	0.06	0.90			0.06	1.27
										0.08	0.57	0.06	0.55	0.08	0.55	0.07	0.85			0.05	0.89
										0.08	0.65			0.08	0.46					0.06	1.37
														0.05	0.36					0.06	1.08
																				0.08	0.87

Anexo 7.- Matriz de datos del ensayo de sobrevivencia de diez serovariedades de *Leptospira* spp., de alto pasaje al suero humano normal

	Aut	Bat	Can	Gri	Hpj	Ict	Pom	Pyr	Tar	Wol	Patoc I										
4.4E+06	1.9E+06	1.0E+06	0.0E+00	1.1E+07	1.4E+06	1.2E+07	8.4E+06	7.3E+06	0.0E+00	1.7E+06	5.0E+04	2.1E+06	5.0E+04	1.7E+06	2.0E+05	2.3E+06	1.5E+05	1.3E+06	5.5E+05	5.1E+06	0.0E+00
3.0E+06	1.6E+06	3.1E+06	1.0E+05	1.7E+07	1.6E+06	1.5E+07	9.3E+06	7.9E+06	0.0E+00	1.8E+06	0.0E+00	2.3E+06	5.0E+04	1.9E+06	3.5E+05	1.6E+06	1.5E+05	4.6E+06	4.5E+05	4.6E+06	0.0E+00
3.7E+06	2.9E+06	4.5E+06	1.0E+05	1.3E+07	1.7E+06	2.0E+07	9.1E+06	1.4E+07	0.0E+00	1.3E+06	0.0E+00	2.6E+06	1.0E+05	1.2E+06	1.0E+05	7.5E+05	3.5E+05	1.7E+06	7.0E+05	4.3E+06	0.0E+00
2.3E+06	1.1E+06	2.4E+06	1.0E+05	1.5E+07	9.0E+06	7.2E+06	7.7E+06	8.3E+06	0.0E+00	1.8E+06	0.0E+00	2.0E+06	0.0E+00	1.4E+06	5.0E+04	1.2E+06	3.0E+05	9.5E+05	6.5E+05	3.2E+06	0.0E+00
2.1E+06	1.1E+06	6.6E+06	1.4E+06	1.0E+07	9.0E+06	9.7E+06	6.3E+06	1.4E+07	0.0E+00	1.8E+06	0.0E+00	1.2E+06	0.0E+00	1.6E+06	1.0E+05	2.0E+06	3.0E+05	2.7E+06	6.0E+05	3.3E+06	0.0E+00
1.9E+06	1.2E+06	8.2E+06	1.1E+06	1.3E+07	5.0E+06	9.5E+06	3.0E+06	1.3E+07	0.0E+00	1.6E+06	0.0E+00	5.4E+06	5.0E+04	1.3E+06	2.5E+05	1.4E+06	5.0E+05	4.6E+06	4.5E+05	4.0E+06	0.0E+00
2.9E+06	1.8E+06	7.6E+06	1.2E+06	2.3E+07	1.4E+06	2.0E+06	1.3E+06	4.0E+06	0.0E+00	1.1E+06	0.0E+00	4.3E+06	5.0E+04	2.0E+06	0.0E+00	7.0E+05	2.5E+05	5.9E+06	9.0E+05	3.8E+06	0.0E+00
2.7E+06	1.3E+06	3.75E+06	5.00E+04	2.6E+07	1.5E+06	2.4E+06	1.4E+06	4.0E+06	0.0E+00	2.0E+06	0.0E+00	5.1E+06	5.0E+04	2.0E+06	1.5E+05	8.5E+05	7.0E+05	7.4E+06	7.5E+05	3.5E+06	0.0E+00
1.5E+06	1.4E+06	3.15E+06	5.00E+04	2.8E+07	2.4E+06	2.5E+06	1.5E+06	4.8E+06	0.0E+00	1.3E+06	2.0E+05	2.6E+06	1.0E+05	1.3E+06	1.5E+05	8.5E+05	5.0E+05	6.3E+06	5.5E+05		
1.8E+07	1.1E+07	3.10E+06	0.0E+00	2.9E+07	3.6E+06	1.5E+06	9.0E+05	1.2E+06	2.0E+05	1.0E+06	1.5E+05	2.0E+06	0.0E+00	1.1E+06	2.0E+05	1.6E+06	4.0E+05	1.4E+06	3.0E+05		
1.3E+07	1.2E+07	2.10E+06	0.0E+00	3.0E+07	6.7E+06	1.5E+06	7.0E+05	2.2E+06	1.0E+05	1.8E+06	5.0E+04	1.2E+06	0.0E+00	1.5E+06	4.5E+05	1.6E+06	3.0E+05	1.6E+06	1.5E+05		
1.7E+07	1.3E+07	1.5E+05	0.0E+00	1.3E+07	5.0E+06	1.1E+06	7.5E+05	3.2E+06	5.0E+04	3.5E+06	0.0E+00	1.1E+06	5.0E+04	1.9E+06	6.5E+05	2.5E+06	4.0E+05	1.7E+06	1.5E+05		
															8.0E+05	1.0E+05					
															8.5E+05	4.5E+05					
															8.5E+05	8.0E+05					
															1.6E+06	5.0E+05					
															1.9E+06	6.0E+05					
															1.7E+06	1.0E+06					

Anexo 8.- Porcentajes de captura de FH por OD 492 nm y de sobrevivencia a SHN y arcosenos de *Leptospira* spp. de alto y bajo pasaje

	% OD 492 nm	Arcoseno	% Sobrevivencia SHN	Arcoseno
LOCaS 46 BP	70%	0.775397497	41%	0.422454062
LOCaS 46 AP	47%	0.489290778	26%	0.263022203
LOVe30 BP	88%	1.0758622	59%	0.631058841
LOVe30 AP	26%	0.263022203	5%	0.050020857
MOCA 45 BP	97%	1.325230809	63%	0.681553212
MOCA 45 AP	84%	0.997283222	70%	0.775397497
Patoc I	39%	0.400631593	0%	0

Anexo 9.- Porcentajes de captura de FH por OD 492 nm y de sobrevivencia a SHN y arcosenos de *Leptospira* spp. de bajo pasaje

	% OD 492 nm	Arcoseno	% Sobrevivencia SHN	Arcoseno
Autumnalis	83%	0.979107684	69%	0.761489053
Bataviae	47%	0.489290778	12%	0.120289882
Canicola	49%	0.512089753	35%	0.357571104
Grippotyphosa	70%	0.775397497	63%	0.681553212
Hardjo	50%	0.523598776	0%	0
Icterohaemorrhagiae	51%	0.53518479	0%	0
Pomona	47%	0.489290778	1%	0.010000167
Pyrogenes	37%	0.379009021	14%	0.140461415
Tarassovi	77%	0.878841152	31%	0.315193032
Wolffi	65%	0.707584437	16%	0.160690653
Patoc I	39%	0.400631593	0%	0