



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**CUANTIFICACIÓN DE LEPTOSPIRAS VIVAS POR
ESPECTROFOTOMETRÍA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

EMA TAKAI

Asesores:

MVZ PhD Alfredo Sahagún Ruiz

MVZ PhD Alejandro de la Peña Moctezuma

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2017





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.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad que me ha dado como estudiante extranjera.

Ai jurado de mi tesis, Dr. Francisco Suárez Güemes, Dr. Edgar Alfonseca Silva, Dra. Maria del Rosario Esperanza Galván Pérez, Dra. Alejandra Mercadillo Sierra, por sus valiosas observaciones y recomendaciones.

A mi asesor de tesis, Dr. Alfredo Sahagún Ruiz, por su gran apoyo, consejos y su paciencia conmigo.

A los profesores, trabajadores y compañeros del departamento de Microbiología e Inmunología, por tratarme siempre con cariño y amabilidad, especialmente a Julianita, por animarme siempre.

Al Dr. Daniel Atilano, por brindarme su conocimiento y sus consejos sobre el cultivo de *Leptospira*.

A David y Alejandra, por apoyarme en los momentos difíciles.

A Dr. Murata, su esposa Tomomi y su hija Sumire, por su asesoría y su enorme apoyo.

Esta investigación fue financiada por el proyecto 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.

Al PAPIIT-UNAM proyecto IN222214-3, por la beca otorgada para realización
de esta tesis.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
Antecedentes.....	3
a) El género <i>Leptospira</i>	3
b) La leptospirosis.....	4
c) Epidemiología.....	6
d) Diagnóstico.....	8
e) Problemática con los métodos de cuantificación.....	9
Justificación.....	13
Hipótesis.....	14
Objetivo.....	14
MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
Curva de crecimiento.....	17
a) Conteo en la cámara de Petroff-Hausser.....	17

b) Comparación de la densidad óptica del cultivo de leptospira a diferentes longitudes de onda.....	18
Comparación del conteo por microscopio y por UFC en placa de agar.....	19
Comparación de R cuadrada de las curvas de calibración con las diferentes longitudes de onda.....	19
Comprobación de las ecuaciones de la curva de calibración.....	21
Análisis estadístico de la comprobación de las ecuaciones de curva de calibración.....	22
RESULTADOS.....	23
DISCUSIÓN.....	50
Interpretación de los resultados.....	50
Hallazgos relevantes.....	53
Razonamiento.....	54
Limitación del estudio.....	58
CONCLUSIONES.....	59
REFERENCIAS.....	60

RESUMEN

EMA TAKAI. Cuantificación de leptospiras vivas por espectrofotometría (bajo la dirección de: Dr. Alfredo Sahagún Ruiz, Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma).

Las especies patógenas del género *Leptospira* causan la leptospirosis, la cual es una enfermedad transmisible de los animales y los humanos. A pesar de que hay numerosas investigaciones sobre el género *Leptospira* y la leptospirosis, aún existen dificultades para la determinación del número de bacterias de manera objetiva y confiable. El método más utilizado para la cuantificación de leptospiras es el conteo directo en cámara de Petroff-Hausser por microscopio de campo oscuro, sin embargo existen inconvenientes que hacen difícil su reproducibilidad. Con la finalidad de establecer un método objetivo y confiable para cuantificar leptospiras, evaluamos suspensiones de la bacteria por espectrofotometría a diferentes longitudes de onda para encontrar la más adecuada de acuerdo a las características físicas de la leptospira. Realizamos un análisis de la correlación entre el conteo directo en cámara de Petroff-

Hausser y los valores de la densidad óptica (OD) en el espectrofotómetro, así como con el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) en agar Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH). En este estudio se mostró una correlación significativa entre el conteo directo en cámara de Petroff-Hausser y los valores de OD con las longitudes de onda; 295nm, 300nm, 380nm, y 400nm. Se señala la posibilidad de cuantificar leptospiras, de manera objetiva, confiable y práctica, utilizando espectrofotometría con longitudes de onda de la luz ultravioleta, además de la OD400nm de luz visible que ya se ha utilizado.

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

a) El género *Leptospira*

Las bacterias del género *Leptospira* pertenecen al Orden Spirochaetales y a la Familia Leptospiraceae (1). Las *Leptospira* difieren de otros géneros bacterianos por su tamaño, forma y estructura de la pared celular, lo cual dificulta su observación en el microscopio de campo claro (2), por lo que es necesario utilizar el microscopio de campo oscuro. Las leptospiras son microorganismos morfológicamente uniformes, pero serológica y epidemiológicamente diversos (3).

Las leptospiras son bacterias de 0.1 a 0.2 μm de ancho y de 6 a 12 μm de largo presentan una forma espiral, la cual puede terminar en un gancho en uno o ambos extremos (4). Aunque su pared celular es semejante a las de bacterias Gram negativas, la tinción de Gram no es aplicable para su observación. Son aerobias, no poseen cápsula, no esporulan, son móviles por medio de endoflagelos (filamento axial) y son muy exigentes en sus requerimientos

nutrimentales en el cultivo *in vitro*. Las leptospiras pueden sobrevivir largo tiempo en el agua o en un ambiente húmedo, templado, con pH neutro o ligeramente alcalino (3).

Ha sido reportada en todos los continentes del mundo excepto en la Antártida (5) y se han aislado a partir de más de 160 especies animales (mamíferos, anfibios y reptiles, etc.) (6). Con base en estudios genéticos recientes se clasifican en 22 especies; 10 especies patógenas, 5 de patogenicidad intermedia y 7 no patógenas (7). Entre las especies patógenas se encuentran más de 300 serovariedades (7), agrupadas en 26 serogrupos (4).

b) La leptospirosis

Cualquiera de las especies patógenas del género *Leptospira* causa la leptospirosis, la cual es una enfermedad transmisible de los animales y humanos (8). La infección en el hombre y en los animales se produce de manera directa o indirecta, a través de las mucosas bucal, nasal y conjuntival, y de abrasiones en la piel. La vía más común es la indirecta, a través de agua, suelo y alimento contaminados por orina de animales infectados (6). Luego de su entrada, rápidamente se establece una infección sistémica, la bacteria daña

el endotelio vascular y capilar, lo que produce extravasación de la sangre, isquemia y anoxia local. La proliferación del microorganismo ocurre a nivel de órganos parenquimatosos como hígado, riñones y bazo, así como en ojos y rara vez en meninges. Posterior al establecimiento de la bacteria en estos órganos, se desarrollan diferentes lesiones (9, 10, 4). Las leptospiras pueden permanecer en los túbulos renales, siendo excretadas por la orina (11).

Los signos clínicos en la leptospirosis varían mucho, desde inaparentes hasta severos, tanto en humanos como en animales. En las personas que desarrollan la enfermedad, se distinguen diferentes formas clínicas; I. La leptospirosis leve con los síntomas de tipo gripal; II. Síndrome de Weil caracterizado por ictericia, falla renal, hemorragia y miocarditis con arritmias; III. Meningitis/meningoencefalitis; IV. Hemorragia pulmonar con falla respiratoria (12). En los animales, los signos varían dependiendo de la especie animal y de la serovariedad de leptospira patógena involucrada (4).

En bovinos la serovariedad Hardjo causa una reducción importante en la producción láctea, falla reproductiva y nacimiento de terneros débiles, mientras que en porcinos, las serovariedades Bratislava, Australis y Pomona causan infertilidad, abortos, mortinatos y nacimiento de lechones débiles. En los equinos,

la serovariedad Bratislava generalmente causa anormalidades oftalmológicas. En caso de perros, la serovariedad Canicola, produce 4 síndromes: icterico, hemorrágico, urémico (enfermedad de Stuttgart) y reproductivo (aborto y nacimiento de cachorros débiles) (5). Muchos animales silvestres, entre ellos algunos roedores, están adaptados a las leptospiras y no manifiestan signos o lesiones (13).

Cabe destacar que los animales infectados crónicamente, pueden ser portadores durante un período considerable (bovinos: unas semanas, porcinos: unos meses a un año, canideos: unos años a toda su vida, ratas: dos a tres años) por lo que pueden favorecer la infección a otros animales, incluyendo a los humanos (4).

c) Epidemiología

En la epidemiología de la enfermedad, el papel de los animales silvestres o domésticos, como portadores, es esencial para el mantenimiento de las leptospiras patógenas en la naturaleza. La enfermedad se encuentra en cualquier lugar en donde los humanos entran en contacto con la orina de animales infectados o a través de un ambiente contaminado con dicha orina. En

este sentido es importante considerar las áreas urbanas con bajos niveles sanitarios.

Los animales de importancia en la transmisión de la leptospirosis, considerando la salud pública y la producción pecuaria, son canideos, bovinos, porcinos, equinos, ovinos, ratas y ratones (9). Otro factor importante es el clima, aunque la leptospirosis ocurre en todo el mundo, es más común en las áreas tropicales y subtropicales con altos índices de precipitación pluvial. Cabe mencionar que la mayoría de los casos de leptospirosis se presentan en lugares donde se llevan a cabo actividades como la agricultura, la manufactura de productos de origen animal, la silvicultura, la ganadería, entre otras (8).

La leptospirosis en humano tiene un porcentaje elevado de mortalidad, aunque generalmente es subclínica, es por esto que se confunde fácilmente con otras enfermedades y se tiende a subestimar el número de pacientes (9). En realidad no se conoce muy bien la situación de esta enfermedad en comparación con otras enfermedades como la malaria, el dengue, la tuberculosis y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), por ende se le considera una enfermedad desatendida (4, 9).

d) Diagnóstico

La enfermedad puede ser diagnosticada en el laboratorio mediante métodos directos como el cultivo, microscopía de campo oscuro, inoculación de animales de experimentación y la reacción en cadena de la polimerasa; así como a través de métodos serológicos indirectos (3). Debido a que los métodos actuales para la detección directa de leptospiras son lentos, su uso es limitado, por otra parte, la serología es, en la mayoría de los casos, el método de diagnóstico más utilizado. Varios métodos serológicos han sido desarrollados, incluyendo el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), la prueba de aglutinación microscópica (MAT), la cual es considerada la “prueba de oro” en comparación con las otras pruebas disponibles actualmente (3). En ambas pruebas de diagnóstico (MAT y ELISA) es necesario determinar el número de leptospiras para la preparación del antígeno, sin embargo este proceso es laborioso y requiere de un tiempo considerable, si se realiza a través del conteo directo en la cámara de Petroff-Hausser para cada cepa empleada.

e) Problemática con los métodos de cuantificación

Existen varios métodos para medir la cantidad de bacterias, tanto directos como indirectos. Por ejemplo, el conteo utilizando una cámara y microscopio óptico, mediante un contador electrónico de partículas, amplificación cuantitativa del ácido nucleico de la bacteria por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de tiempo real, el conteo de UFC en placas de agar, o por turbidimetría, entre otros (16). El método más utilizado es el conteo en cámara de Petroff-Hausser utilizando un microscopio de campo oscuro (3, 14, 15, 10), debido a que es relativamente fácil para contar leptospiras vivas, comparando con otros métodos.

La cámara de Petroff-Hausser consiste en un portaobjetos especial con una graduación en la superficie con medidas concretas, como una excavación de 0.02mm de profundidad, un área de 1mm^2 , dividida en 25 cuadros grandes y cada cuadro grande está subdividido a su vez en 16 cuadros pequeños. La muestra se distribuye en $16 \times 25 = 400$ celdillas (cuadros pequeños). Una vez dispersada la muestra entre la cámara y el cubreobjetos, se deja reposar sobre la platina del microscopio durante unos minutos, y se cuenta el número de células en 5 cuadros (cada uno con 16 cuadros pequeños). Se anota el número

(n) de células promedio observadas. Entonces, la concentración celular se establece multiplicando, $n \times 25 \times 50 \times 1000 \times$ factor de dilución. Con ello obtenemos la concentración de células por ml (17).

Este método es muy útil porque permite distinguir la viabilidad y morfología de las leptospiras, sin embargo es difícil su reproducibilidad, debido al movimiento de la bacteria en el líquido, al bajo índice de refracción de las leptospiras, a la necesidad de preparación de una dilución adecuada y la diferencia en la habilidad técnica de los operadores; por ende su desventaja es la falta de objetividad (14, 10).

En la investigación de la leptospirosis, es importante conocer el número de leptospiras vivas por diversas razones, como mantener la calidad de cultivo, evaluar productos farmacéuticos, preparar antígeno para diagnóstico, o preparar algún inóculo para realizar ensayos biológicos (14). Sin embargo, determinar el número de leptospiras es complicado porque se carece de una técnica objetiva y precisa (14, 15)

Existen investigaciones publicadas que buscan una mayor objetividad para enfrentarse al problema del conteo de leptospiras. Humberd C., et al. 2005 (15) demostraron que utilizando el contador Coulter, es práctico contar las

leptospiras, obteniendo una correlación significativa entre el conteo en cámara de Petroff-Hausser y el conteo automático en el contador Coulter, utilizando un medio de cultivo diluido 1: 1,000 (15). No obstante el aparato tiene un costo elevado, por lo que podría no estar disponible en muchos laboratorios (14). Schreier S., et al. 2009 (14) propusieron un método rápido y económico para cuantificar leptospiras, por medio de la detección de sus ácidos nucleicos con la longitud de onda 260nm. Se demostró una correlación muy estrecha entre el conteo en cámara de Petroff-Hausser y la detección de sus ácidos desoxirribonucleicos (ADN) a OD260nm (14), sin embargo no es práctico, debido a que requiere una preparación previa de la muestra.

El método ideal para cuantificar leptospiras vivas debería ser objetivo y práctico, que se pudiera llevar a cabo directamente en una muestra de cultivo sin ninguna manipulación previa.

Tomando como referencia estos antecedentes, nos planteamos el objetivo de buscar un método objetivo y práctico que pueda ser utilizado en cualquier laboratorio, basado en la OD del cultivo, determinada por espectrofotometría y como referencia utilizamos la cuantificación en cámara de Petroff Hausser por microscopía de campo oscuro y por UFC en placas de agar EMJH.

Los ensayos de cuantificación de leptospiras por espectrofotometría, se han reportado desde 1973, utilizando la longitud de onda 400nm con el medio de EMJH sin dilución y se obtuvo una alta correlación entre OD400nm y número de bacterias en microscopio (14, 18, 19, 20, 21, 22). Sin embargo, sólo se menciona en el texto y no se describe en detalle el método ni se da una explicación para utilizar OD400nm.

Por lo que en primer lugar buscamos una longitud de onda que permitiera una separación mayor entre las diluciones del cultivo de *Leptospira* para poder diferenciar mejor la concentración de bacterias por espectrofotometría.

Adicionalmente, en la búsqueda de la longitud de onda, consideramos el material de la cubeta a utilizar, el cual tiene que ser de cuarzo o de polimetilmetacrilato para longitudes de onda de luz ultravioleta. Es posible que no todos los laboratorios tengan disponibles cubetas de estos materiales, por lo que consideramos también una longitud de onda de luz visible para que se pueda utilizar con cubetas de plástico o de vidrio.

Justificación

A pesar de que hay numerosas investigaciones sobre el género *Leptospira* y la leptospirosis, aún existen dificultades en el manejo de esta bacteria y una de estas dificultades es la determinación de su número de manera objetiva y precisa (23). El método más utilizado para la cuantificación de leptospiras es el conteo en cámara de Petroff-Hausser, por microscopía de campo oscuro, sin embargo existen algunos inconvenientes que hacen difícil su reproducibilidad.

Por tal motivo, buscamos un método adecuado para determinar el número de leptospiras vivas, analizando la correlación entre el valor OD de la muestra en espectrofotómetro, con el conteo en cámara de Petroff-Hausser y con el conteo de UFC en agar EMJH.

Hipótesis

El número de leptospiras determinado con la curva de calibración obtenida por espectrofotometría será igual al determinado por microscopía de campo oscuro en la cámara de Petroff-Hausser.

Objetivo

Estandarizar un método objetivo, confiable y práctico para la cuantificación de leptospiras vivas por espectrofotometría.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

Cepa de *Leptospira*

Leptospira biflexa sv. Patoc cepa Patoc1 fue obtenida del Royal Tropical Institute, Amsterdam, Holanda, donada por el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano, FMVZ, UNAM Tequisquiapan, Querétaro, y fue cultivada por 4 días, en una incubadora BINDER, a 29 °C, en aerobiosis en el medio de cultivo EMJH.

METODOLOGÍA

Inicialmente, se determinó la curva de crecimiento de *Leptospira biflexa* sv. Patoc cepa Patoc1, por conteo en la cámara de Petroff-Hausser en microscopio de campo oscuro, con el fin de constatar número y viabilidad bacteriana del día 0 al 7. Simultáneamente, se determinó la densidad óptica de cada una de las muestras en una cubeta de cuarzo utilizando un espectrofotómetro; Ultrospec

3000 UV/Visible spectrophotometer de Pharmacia Biotech. Los cultivos fueron leídos con las longitudes de onda de 293nm, 295nm, 300nm, 350nm, 380nm, 400nm y 600nm, con la finalidad de eliminar las longitudes de onda con menor poder de resolución, para encontrar la longitud de onda que permitiera diferenciar mejor el número de bacterias en las muestras de cada día. Por otra parte, se verificó la correlación entre el conteo directo en la cámara de Petroff-Hausser y el conteo por UFC en placas de agar EMJH, también considerado como otro método de conteo directo. Posteriormente se elaboró una curva de calibración de diluciones de leptospira por espectrofotometría, utilizando sus OD con las longitudes de onda que no fueron eliminadas y se analizaron por el modelo de regresión lineal.

Se compararon los números de bacterias determinados por las ecuaciones de las curvas de calibración con las longitudes de onda seleccionadas, contra los contados en la cámara de Petroff-Hausser en microscopio de campo oscuro. Para comprobar que las ecuaciones fueran capaces de estimar el número aproximado de leptospiras, se realizó el análisis de regresión lineal utilizando el programa estadístico JMP 11 (Software de análisis estadístico. Versión 11. 2013. SAS Institute Inc.) (24).

Curva de crecimiento

Se realizaron tres experimentos independientes preparando para cada uno 24 tubos con 9mL de medio de cultivo EMJH y 1mL de cultivo de 4 días de *Leptospira biflexa* sv. Patoc cepa Patoc1, para evaluar su desarrollo diariamente por triplicado durante 7 días. Se utilizó el promedio del conteo de leptospiras en la cámara de Petroff-Hausser de 9 tubos (3 de cada experimento), para graficar las curvas de crecimiento, así como el promedio de sus valores de OD para graficar las curvas de crecimiento basadas en las longitudes de onda 295nm, 300nm, 380nm y 400nm; mientras que para las longitudes de onda de 293nm, 350nm y 600nm sólo se utilizó el promedio de 3 tubos de un experimento.

a) Conteo en la cámara de Petroff-Hausser

Se realizó el conteo de leptospiras a partir de un cultivo diluido 1:100, excepto en el día 0 que sólo se hizo dilución doble, en medio EMJH, en la cámara de Petroff-Hausser desde el día 0 hasta el día 7 (3 tubos por cada día) utilizando un microscopio de campo oscuro. En la cámara se contaron los cuatro cuadros de los extremos y el cuadro central (cada uno con 16 cuadros). Se tomó el promedio de los 5 cuadros y se multiplicó por el número de cuadros en la

cámara que son 25; por el factor de volumen de la cámara que es 50; por el factor de dilución que fue 100 y por 1000 para obtener el número de leptospiras por mL. Se elaboró la curva de crecimiento de *Leptospira biflexa* sv Patoc cepa Patoc I, utilizando una gráfica de línea en Excel (Microsoft Office, 2013) con el número de bacterias por día. Se utilizó la desviación estandar para analizar los datos de número de bacterias por día y posteriormente el coeficiente de variación para realizar una comparación de desviación entre los días, considerando las diferencias en el tamaño de los datos por día. La interpretación del coeficiente de variación es que menos de 25% indica que las muestras son homogéneas.

b) Comparación de la densidad óptica del cultivo de leptospira a diferentes longitudes de onda

Inmediatamente después de realizar el conteo en la cámara de Petroff-Hausser de tres tubos del cultivo, se tomó 1mL de cada uno y de manera independiente y se determinó su valor de OD, de los cultivos del día 0 hasta el día 7, por espectrofotometría con las longitudes de onda de 293nm, 295nm, 300nm, 350nm, 380nm, 400nm y 600nm. Se compararon las curvas obtenidas

con las diferentes longitudes de onda en el rango viable de la cepa, definido por la curva de crecimiento, para descartar las longitudes de onda que no fueran útiles para la cuantificación de leptospira, considerando dos criterios: la inestabilidad en el ajuste de la línea basal y el grado de la pendiente.

Comparación del conteo por microscopio y por UFC en placas de agar.

Se realizaron dos diluciones céntuplas (1:100) y cuatro dobles (1:2), a partir de aproximadamente 3×10^8 leptospiras en medio EMJH previamente contadas en la cámara de Petroff-Hausser. A partir de las tres últimas diluciones dobles se tomaron 50 μ L y fueron sembrados por triplicado en placas de medio EMJH con 1.2% de agar. Los cultivos fueron incubados a 29°C por 18 días y las UFC fueron contadas para comparar con el resultado del conteo en cámara de Petroff-Hausser.

Comparación de R cuadrada de las curvas de calibración con las diferentes longitudes de onda

Para comparar los modelos de regresión lineal correspondientes a las diferentes longitudes de onda, se elaboraron curvas de calibración.

En un tubo de 50 mL (Falcón), se vertieron 4 tubos del cultivo de leptospiras del cuarto día, se mezcló manualmente y se tomaron 10 μ L para contar en cámara de Petroff-Hausser en una dilución de 1:100 en medio EMJH. Una vez determinada la concentración, se centrifugó el cultivo a 13,500 xg durante 20 minutos a 20°C, enseguida se resuspendió la pastilla en 3 mL de medio EMJH y se ajustó la concentración a $16 \times 10^8/2\text{mL}$ y $12 \times 10^8/2\text{mL}$ en medio EMJH, para hacer diluciones dobles seriadas por triplicado, conteniendo $8 \times 10^8/\text{mL}$, $6 \times 10^8/\text{mL}$, $4 \times 10^8/\text{mL}$, $3 \times 10^8/\text{mL}$, $2 \times 10^8/\text{mL}$, $1.5 \times 10^8/\text{mL}$, $1 \times 10^8/\text{mL}$ y $0.5 \times 10^8/\text{mL}$ leptospiras.

Nuevamente se realizó el conteo en cámara de Petroff-Hauser en cada muestra a partir de las diluciones seriadas y posteriormente se midió su valor de OD en cada una de ellas, por espectrofotometría con las longitudes de onda que no habían sido eliminadas en el experimento de la curva de crecimiento. Se compararon la R cuadrada (R^2) correspondiente a las diferentes longitudes de onda con el programa estadístico JMP 11, para seleccionar las longitudes de onda, con valores de R^2 más cercano a 1.

Finalmente se obtuvieron las curvas de calibración con las longitudes de onda seleccionadas con el objetivo de estimar el número de leptospiras utilizando las

ecuaciones obtenidas.

Con el fin de utilizar las ecuaciones de regresión lineal para cuantificar el número de leptospiras con base en su valor de densidad óptica, se colocaron los valores de OD en el eje de las X y el número de bacterias contado por microscopio en el eje de las Y.

Comprobación de las ecuaciones de la curva de calibración

Se utilizaron 15 muestras independientes de *Leptospira biflexa* sv Patoc cepa Patoc I en el medio EMJH por triplicado, considerando el periodo viable de la curva de crecimiento (entre el día 0 y 5)

Inmediatamente después de realizar el conteo de 3 tubos de cultivo del mismo día de cada muestra en la cámara de Petroff-Hausser con microscopio de campo oscuro, se tomó 1mL y de cada cultivo e independiente se obtuvo su valor de densidad óptica. El resultado es el promedio de las lecturas de tres tubos por muestra.

Se calcularon los números de leptospiras con las ecuaciones obtenidas de la curva de calibración, insertando los valores de OD correspondientes en la X de la ecuación. A continuación se elaboró una gráfica para analizar la asociación

del número de leptospiras por conteo en microscopio con el obtenido por las ecuaciones de cada longitud de onda y se compararon contra una recta ideal, donde $y = x$, con el fin de comprobar si las ecuaciones obtenidas son capaces de estimar el número de leptospiras, con base al valor de OD.

Análisis estadístico de la comprobación de las ecuaciones de curva de calibración

Para saber si existe probabilidad de diferencia entre las rectas, se utilizó el intercepto y la pendiente con un intervalo de confianza de 95%, para elaborar un diagrama de dispersión (asociación entre 2 variables) utilizando el programa estadístico JMP 11. Este análisis se realizó con los datos originales y posteriormente eliminando los valores atípicos por medio del método de Jackknife (JMP 11) (25).

RESULTADOS

Curva de crecimiento

a) Conteo en la cámara de Petroff-Hausser

Se elaboró la curva de crecimiento de *Leptospira biflexa* sv Patoc cepa Patoc I obtenida por conteo directo en cámara de Petroff-Hausser en campo obscuro. Analizando los datos de la curva de crecimiento, encontramos que del día 0 al día 2 existe un desarrollo ascendente relativamente rápido, mientras que del día 2 al 3 continua el ascenso pero a un ritmo menor y entre el día 3 y 5 el desarrollo ascendente es aún más rápido, y a partir del día 5 se observa un descenso paulatino. La curva de crecimiento de *Leptospira biflexa* sv. Patoc cepa Patoc 1 por conteo en cámara de Petroff-Hausser, indica que el tiempo del cultivo viable es del día 0 al día 5 (Figura 1). Por lo tanto, la comparación de los valores de densidad óptica a diferentes longitudes de onda de la curva de crecimiento, se realizó considerando ese rango (de día 0 a día 5). Se observó el número de leptospiras más alto en el día 5 con promedio de 3.764×10^8 , con una desviación estándar de 0.945×10^8 y con un coeficiente de variación de 25% (Cuadro 1).

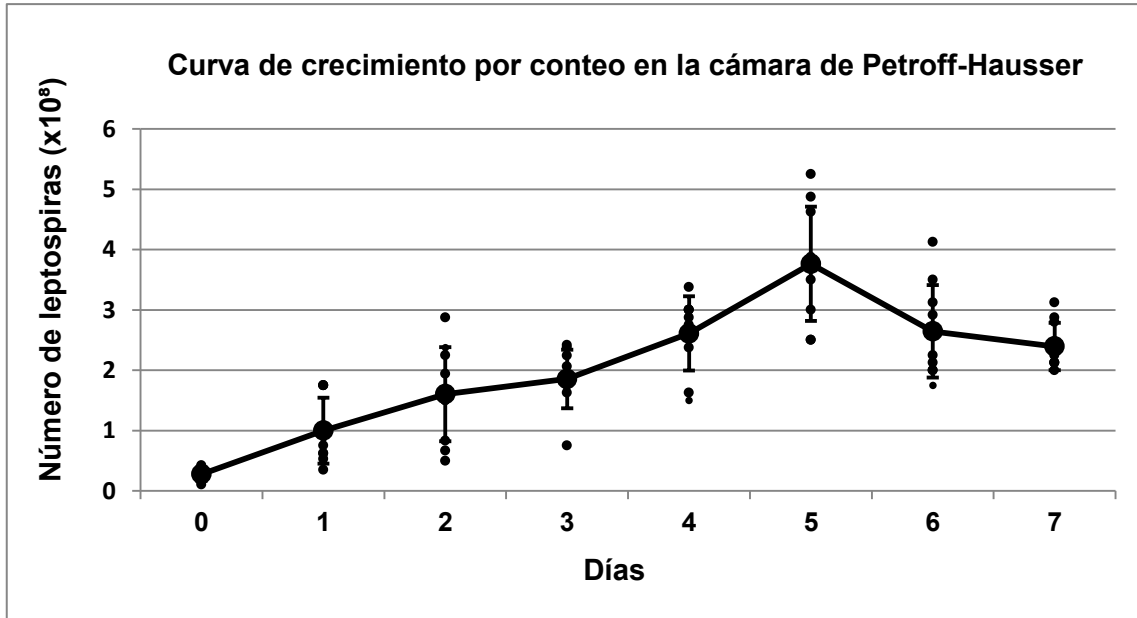


Figura 1: Curva de crecimiento de *Leptospira biflexa* sv Patoc cepa Patoc I, basada en conteo directo en la cámara de Petroff-Hausser por microscopía de campo oscuro de cultivos de 0 a 7 días. Las barras verticales muestran la desviación estandar. Los puntos por día muestran el número de leptospiras por tubo.

Cuadro 1
Promedio, desviación estandar y coeficiente
de variación de los datos por día de la curva de crecimiento

	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Promedio								
(x10 ⁸)	0.279	1.000	1.604	1.858	2.611	3.764	2.643	2.394
Desviación de estandar								
(x10 ⁸)	0.110	0.547	0.779	0.485	0.614	0.945	0.766	0.394
Coeficiente de variación								
(x10 ⁸)	39%	55%	49%	26%	24%	25%	29%	16%

b) Comparación de la densidad óptica del cultivo de leptospira a diferentes longitudes de onda

Se elaboró la curva de crecimiento de *Leptospira biflexa* sv. Patoc cepa Patoc1 por su valor de densidad óptica. La figura 2 muestra que todos los valores de la densidad óptica con las diferentes longitudes de onda tendieron a aumentar con el tiempo. Debido a que la curva de crecimiento elaborada con el valor de densidad óptica, no permite diferenciar la acumulación de células muertas de las vivas, se consideró el rango de viabilidad desde el día 0 y hasta el día 5, por referencia a la curva de crecimiento elaborada por el conteo en la cámara de Petroff-Hausser. Los valores de OD en las longitudes de onda de la luz ultravioleta (293nm, 295nm, 300nm y 350nm) producen una línea con una pendiente mayor que las de luz visible (380nm, 400nm y 600nm).

Dentro de las longitudes de onda de la luz ultravioleta, la de 293nm fue inestable para el ajuste de la línea basal al momento de medir la densidad óptica, ya que no se pudo mantener en cero estáticamente y por esta razón se eliminó (Figura 2; curva punteada de 293nm). La longitud de onda 350nm también fue eliminada debido a que su pendiente fue la menor de las de luz ultravioleta (Figura 2; curva punteada de 350nm). En cuanto a la luz visible, la

longitud de onda de 600nm resultó con la pendiente más baja, por lo que fue eliminada (Figura 2; curva punteada de 600nm). Las longitudes de onda que no fueron eliminadas incluyeron 295nm, 300nm de luz ultravioleta y 380nm y 400nm de luz visible (Figura 2; curvas líneas continuas).

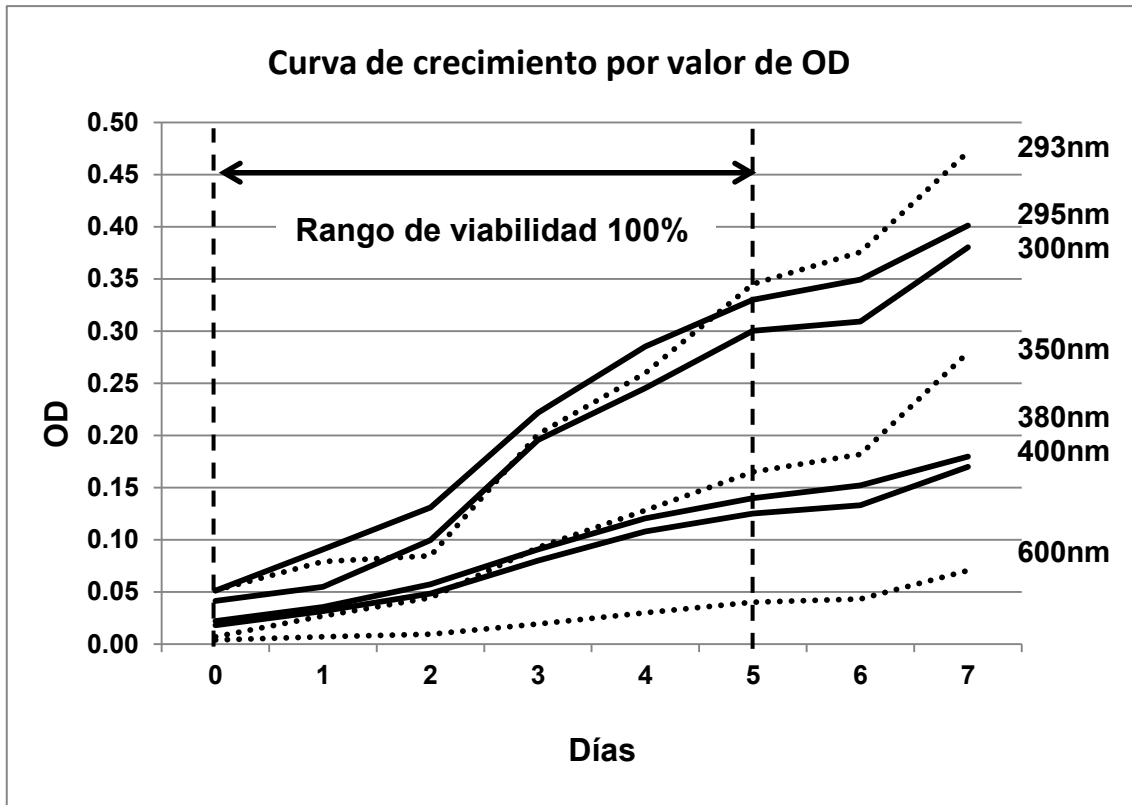


Figura 2: Curva de crecimiento elaborada por el valor de la densidad óptica del cultivo de leptospira del día 0 al día 7 con las longitudes de onda 293nm (punteada), 295nm, 300nm y 350nm (punteada) de la luz ultravioleta, así como 380nm, 400nm y 600nm (punteada) de la luz visible. El rango de viabilidad 100%, se consideró del día 0 al día 5, debido a que después del día 5 se empezaron a observar leptospiras muertas.

Comparación del conteo por microscopio con el de UFC en placas de agar

Se realizó el conteo de UFC al día 18 de incubación y todas las placas se comportaron un logaritmo en base diez abajo que el número obtenido por conteo directo en cámara de Petroff-Hausser en el microscopio de campo obscuro (Figura 3 y Cuadro 2).

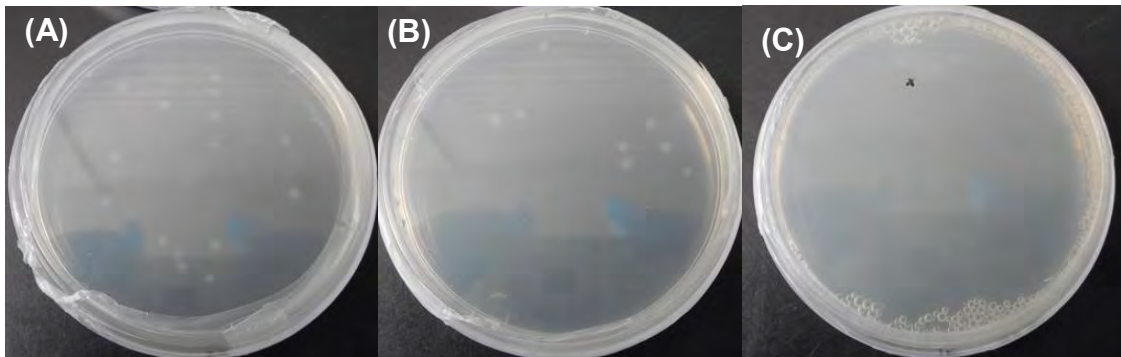


Figura 3: Colonias de *Leptospira biflexa* sv. Patoc cepa Patoc1 a partir de la dilución del cultivo de 4.2×10^8 . Se realizaron 3 experimentos independientes sembrando cada dilución por triplicado, se muestran placas representativas. (A) Dilución de $1:4 \times 10^4$ del cultivo original. (B) Dilución de $1:8 \times 10^4$ del cultivo original. (C) Dilución de $1:16 \times 10^4$ del cultivo original.

Cuadro2

**Comparación del conteo por microscopio y
por unidades formadoras de colonia**

	Métodos del conteo directo	Dilución		
		1:4x10 ⁴	1:8x10 ⁴	1:16x10 ⁴
1	Microscopio	2.1x10 ² (210)	1.05x10 ² (105)	5.3x10 ¹ (53)
	UFC	2.4x10 ¹ (24)	1x10 ¹ (10)	5x10 ⁰ (5)
2	Microscopio	2.6x10 ² (260)	1.4x10 ² (140)	6.5x10 ¹ (65)
	UFC	2.9x10 ¹ (29)	1.6x10 ¹ (16)	2x10 ⁰ (2)
3	Microscopio	3.8x10 ² (380)	1.9x10 ² (190)	9.3x10 ¹ (93)
	UFC	3.9x10 ¹ (39)	1.6x10 ¹ (16)	9x10 ⁰ (9)

Resultado de la comparación del número de bacterias determinadas por conteo directo en la cámara de Petroff-Hausser y el conteo de UFC en placas de agar EMJH. Cada dilución fue sembrada por triplicado y se presentan los promedios de los datos de tres experimentos independientes.

Comparación de R^2 de las curvas de calibración con las diferentes longitudes de onda

El análisis de los resultados de la comparación de los modelos de regresión entre las longitudes de ondas 295nm, 300nm, 380nm y 400nm en la curva de calibración, muestra que la longitud de onda de 295nm y de 300nm para luz ultravioleta tienen una R^2 de 0.9981 y 0.9940, respectivamente, mientras que la de 380nm y de 400nm para luz visible tienen una R^2 de 0.9906 y 0.9961, respectivamente (Figura 4 y Cuadro 3).

Con este resultado fue difícil seleccionar la mejor longitud de onda, debido a que las R^2 de todas las longitudes de onda resultaron arriba de 0.99. Por ende se utilizaron las ecuaciones de cada longitud de onda (OD295nm, OD300nm, OD380nm, OD400nm) para realizar su comprobación, comparando con el número de leptospiras obtenido por conteo en microscopio y el obtenido por las ecuaciones de cada longitud de onda. Para utilizar las ecuaciones de regresión lineal en la cuantificación de leptospiras con base a su densidad óptica, se colocaron los valores de OD en el eje de las X y el número de bacterias contado por microscopio en el eje de las Y (Figura 5 y Cuadro 4).

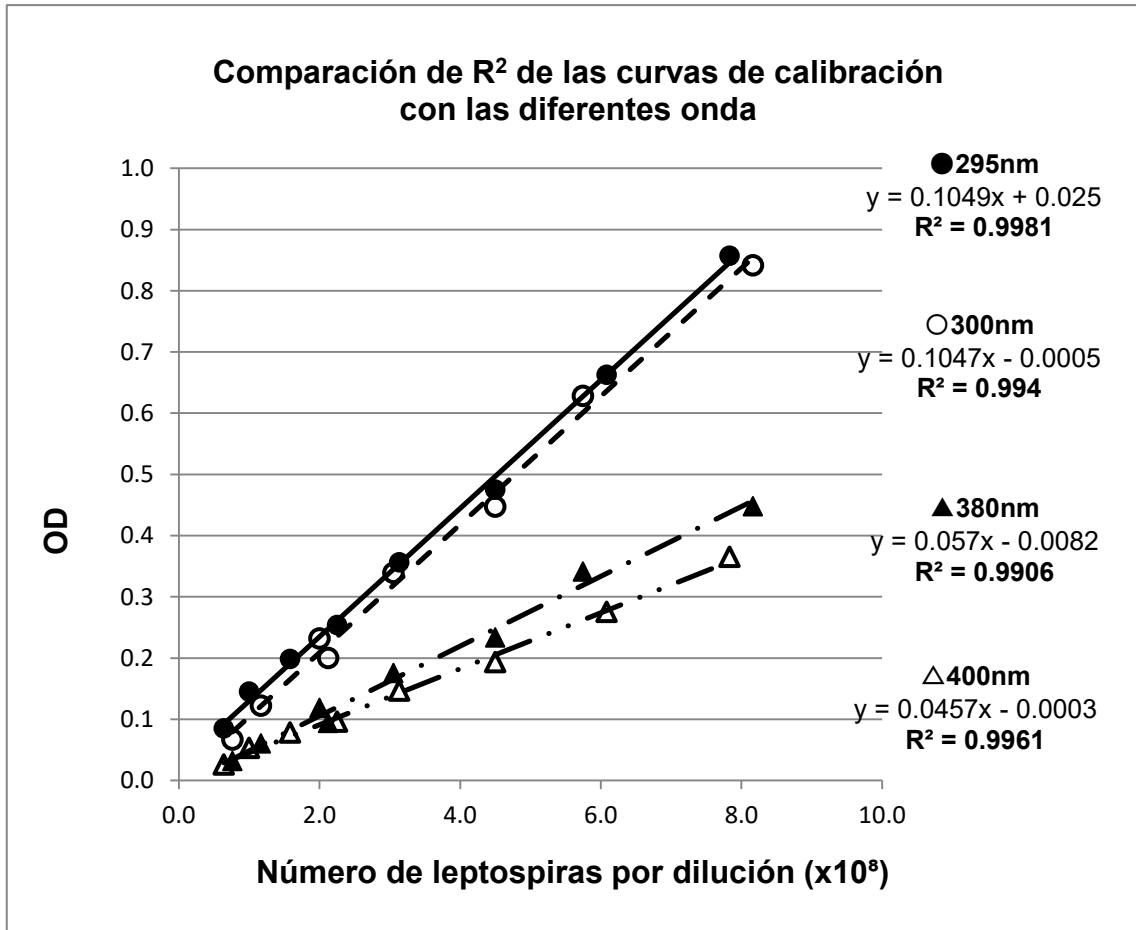


Figura 4: Comparación de los modelos de la regresión lineal correspondiente a las longitudes de onda 295nm, 300nm, 380nm y 400nm.

Cuadro 3
Comparación de R^2 correspondiente
a las diferentes longitudes de onda en la curva de calibración

Longitud de onda	R^2
295nm	0.998
300nm	0.994
380nm	0.990
400nm	0.996

Resultado de la comparación de la R^2 en la curva de calibración entre las longitudes de onda 295nm, 300nm, 380nm y 400nm.

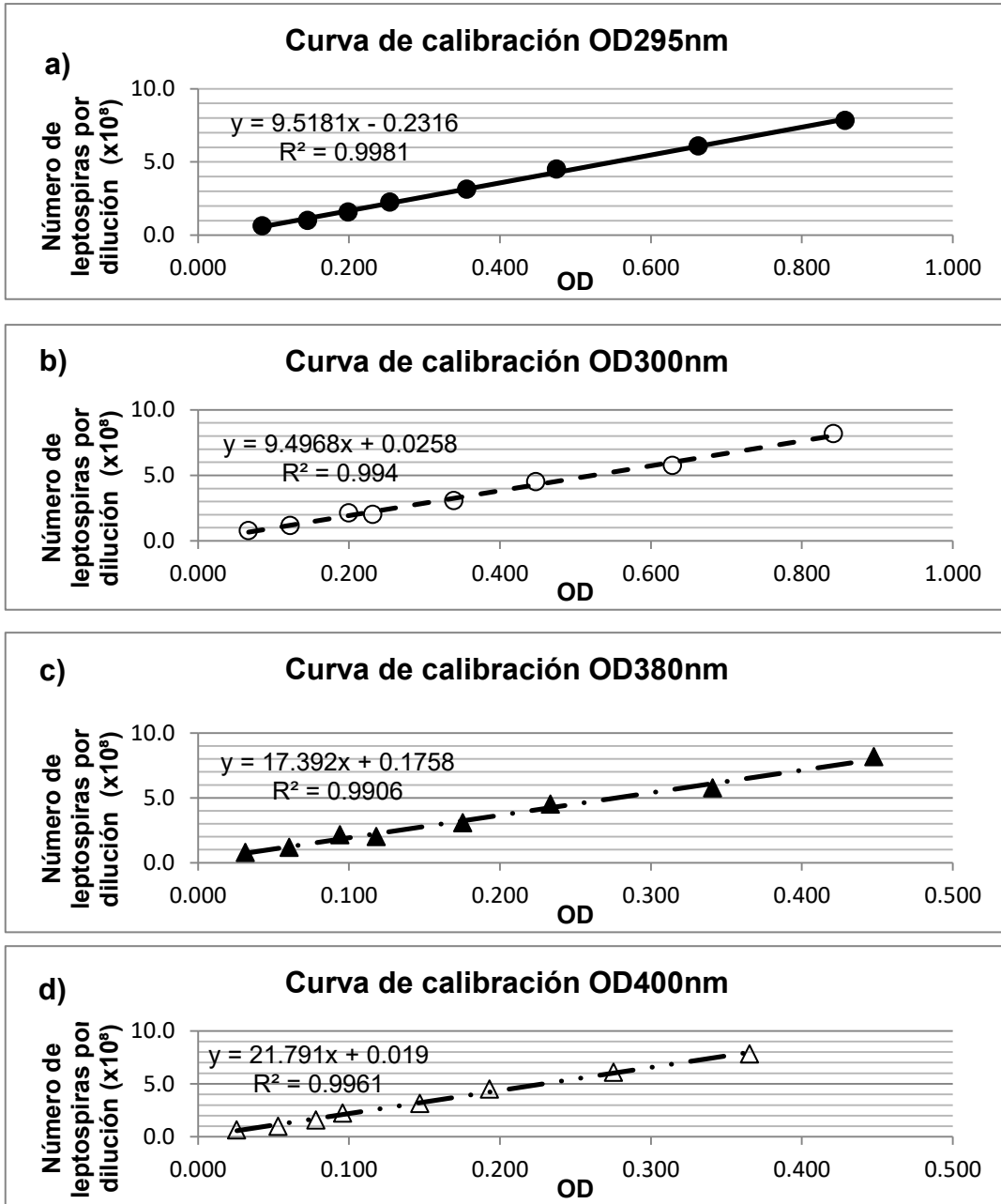


Figura 5: Curvas de calibración a partir de diluciones de bacteria (eje de Y) con los valores de OD obtenidos con las longitudes de onda a) 295nm, b) 300nm, c) 380nm y d) 400nm (eje de X).

Cuadro 4**Ecuaciones de las curvas de calibración**

Longitudes de onda	Ecuación
295nm	$y = 9.5181x - 0.2316$
300nm	$y = 9.4968x + 0.0258$
380nm	$y = 17.392x + 0.1758$
400nm	$y = 21.791x + 0.019$

Ecuaciones de las curvas de calibración por el valor de OD con las longitudes de onda 295nm, 300nm, 380nm, y 400nm.

Comprobación de las ecuaciones de la curva de calibración

Los datos (15 muestras) del número de leptospiras por las ecuaciones de la curva de calibración con OD295nm, OD300nm, OD380nm y OD400nm y los de la cámara de Petroff-Hausser en microscopio de campo oscuro se muestran en los cuadros 5, 6, 7 y 8, respectivamente. La comprobación de estas ecuaciones, muestra que ninguna de las rectas (OD295nm, OD300nm, OD380nm y OD400nm) coincidió con la recta punteada donde $y = x$ (Figura 6).

Cuadro 5

Número de leptospiras (LS) estimado por microscopía y por la ecuación de la curva de calibración con OD295nm

Muestras	Núm LS microscopía (x10⁸)	OD295nm	Núm LS OD295nm y = 9.5181x - 0.2316 (x10⁸)
1	2.2	0.152	1.2151912
2	2.24	0.234	1.9956754
3	2.958	0.3533	3.13118473
4	3.375	0.3606	3.20066686
5	0.75	0.099	0.7107319
6	1.9375	0.156	1.2532636
7	1.958	0.251	2.1574831
8	2.416	0.258	2.2241098
9	4.29	0.303	2.6524243
10	1.375	0.184	1.5197704
11	2.458	0.244	2.0908564
12	3.625	0.326	2.8713406
13	0.145	0.0426	0.17391106
14	0.5	0.0753	0.48515293
15	0.665	0.082	0.5489242

Cuadro 6

Número de leptospiras (LS) estimado por microscopía y por la ecuación de la curva de calibración con OD300nm

Muestras	Núm LS microscopía (x10 ⁸)	OD300nm	Núm LS OD300nm y = 9.4968x + 0.0258 (x10 ⁸)
1	2.2	0.096	0.9375168
2	2.24	0.193	1.8587064
3	2.958	0.263	2.5234824
4	3.375	0.342	3.2737296
5	0.75	0.057	0.5671416
6	1.9375	0.122	1.1844336
7	1.958	0.233	2.2385784
8	2.416	0.254	2.4380112
9	4.29	0.274	2.6279472
10	1.375	0.16	1.545312
11	2.458	0.219	2.1056232
12	3.625	0.285	2.732412
13	0.145	0.029	0.3012312
14	0.5	0.049	0.4911672
15	0.665	0.08	0.785568

Cuadro 7

**Número de leptospiras (LS) estimado por microscopía
y por la ecuación de la curva de calibración con OD380nm**

Muestras	Núm LS microscopía (x10⁸)	OD380nm	Núm LS OD380nm y = 17.392x + 0.1758 (x10⁸)
1	2.2	0.077	1.514944
2	2.24	0.101	1.932352
3	2.958	0.146	2.714992
4	3.375	0.162	2.993264
5	0.75	0.04	0.87144
6	1.9375	0.066	1.323632
7	1.958	0.103	1.967136
8	2.416	0.117	2.210624
9	4.29	0.131	2.454112
10	1.375	0.068	1.358416
11	2.458	0.099	1.897568
12	3.625	0.127	2.384544
13	0.145	0.005	0.26272
14	0.5	0.018	0.488816
15	0.665	0.029	0.680128

Cuadro 8

Número de leptospiras (LS) estimado por microscopía y por la ecuación de la curva de calibración con OD400nm

Muestras	Núm LS microscopía (x10⁸)	OD400	Núm LS OD400nm y = 21.791x + 0.019 (x10⁸)
1	2.2	0.06833	1.50799703
2	2.24	0.0945	2.0782675
3	2.958	0.1333	2.9237583
4	3.375	0.145	3.178713
5	0.75	0.0335	0.7490165
6	1.9375	0.053	1.173941
7	1.958	0.088	1.936626
8	2.416	0.105	2.307073
9	4.29	0.118	2.590356
10	1.375	0.057	1.261105
11	2.458	0.085	1.871253
12	3.625	0.112	2.45961
13	0.145	0.006	0.149764
14	0.5	0.014	0.324092
15	0.665	0.0233	0.5267483

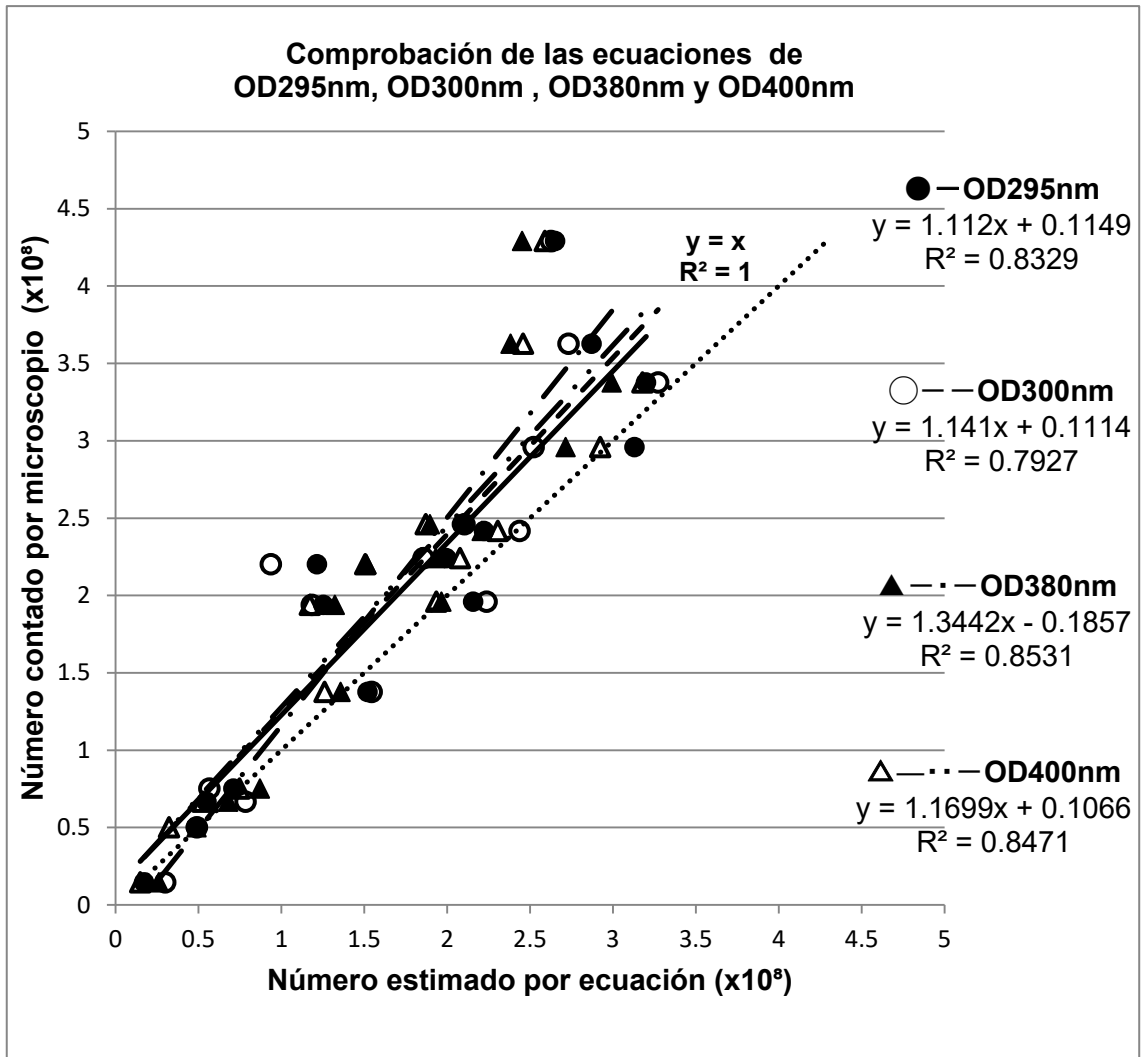


Figura 6: Comprobación de las ecuaciones de la curva de calibración con OD295nm, OD300nm, OD380nm y OD400nm. La recta punteada es donde $y = x$, y ninguna de las rectas coincidieron.

Análisis estadístico de la comprobación de los resultados de las 15 muestras

a) Los datos originales

El intercepto estimado del modelo de todas las rectas es compatible con la hipótesis de que el intercepto es igual a 0. En cuanto a la pendiente estimada del modelo de todas las rectas, es compatible con la hipótesis de que la pendiente es igual a 1, excepto la OD380nm (Cuadro 9).

Cuadro 9

Análisis de las regresiones lineales utilizando los parámetros (intercepto y pendiente) con 95% de intervalo de confianza

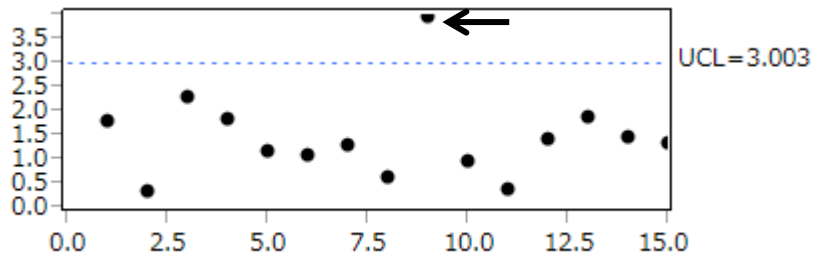
Longitudes de onda	Puntos de análisis	95% Intervalo de confianza	
		LL	UL
OD295nm	Intercepto	-41556090.24	66136086.24
	Pendiente	0.83950136	1.37981064
OD300nm	Intercepto	-47166614.88	74450318.88
	Pendiente	0.81864448	1.44908632
OD380nm	Intercepto	-70662998.36	40363910.36
	Pendiente	1.03272356	1.63428284
OD400nm	Intercepto	-38983086.56	63407258.56
	Pendiente	0.8962089	1.4344641

b) Valores atípicos eliminados

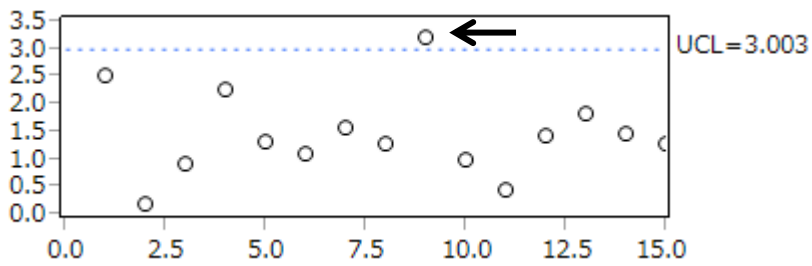
El resultado del método de Jackknife demostró que los valores de la muestra 9 son atípicos. (Figura 7, y Cuadro 10). Con base a este resultado se elaboró nuevamente una gráfica eliminando los valores atípicos, donde se realiza el análisis estadístico sobre el intercepto y la pendiente para saber si OD380nm es realmente diferente que las demás rectas (Figura 8).

El intercepto estimado del modelo de todas las rectas es compatible con la hipótesis de que el intercepto igual a 0. En cuanto a la pendiente estimada del modelo de todas las rectas, es compatible con la hipótesis de que la pendiente igual a 1, excepto para la recta con OD380nm (Cuadro 11).

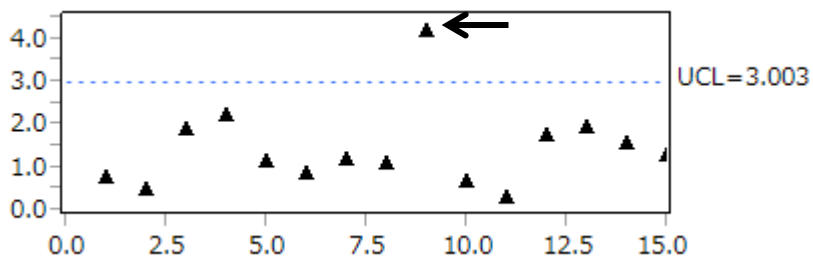
a) OD295nm



b) OD300nm



c) OD380nm



d) OD400nm

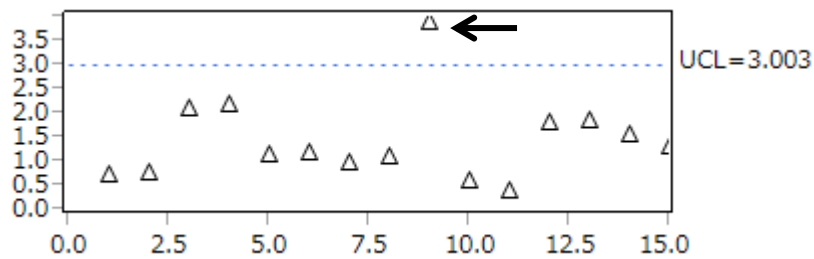


Figura 7 : Las puntas de flecha señalan que la muestra 9 es un valor atípico de los datos de a) OD295nm, b) OD300nm, c) OD380nm y d) OD400nm.

Cuadro 10

Número de leptospiras (LS) estimado por microscopía
y por las ecuaciones de curva de calibración con
OD295nm, OD300nm, OD380nm y OD400nm

Muestra	Núm LS micro (x10 ⁸)	Núm LS OD295nm (x10 ⁸)	Núm LS OD300nm (x10 ⁸)	Núm LS OD380nm (x10 ⁸)	Núm LS OD400nm (x10 ⁸)
1	2.2	1.2151912	0.9375168	1.514944	1.50799703
2	2.24	1.9956754	1.8587064	1.932352	2.0782675
3	2.958	3.13118473	2.5234824	2.714992	2.9237583
4	3.375	3.20066686	3.2737296	2.993264	3.178713
5	0.75	0.7107319	0.5671416	0.87144	0.7490165
6	1.9375	1.2532636	1.1844336	1.323632	1.173941
7	1.958	2.1574831	2.2385784	1.967136	1.936626
8	2.416	2.2241098	2.4380112	2.210624	2.307073
9	4.29	2.6524243	2.6279472	2.454112	2.590356
10	1.375	1.5197704	1.545312	1.358416	1.261105
11	2.458	2.0908564	2.1056232	1.897568	1.871253
12	3.625	2.8713406	2.732412	2.384544	2.45961
13	0.145	0.17391106	0.3012312	0.26272	0.149764
14	0.5	0.48515293	0.4911672	0.488816	0.324092
15	0.665	0.5489242	0.785568	0.680128	0.5267483

Todos los valores de la muestra 9 son valores atípicos.

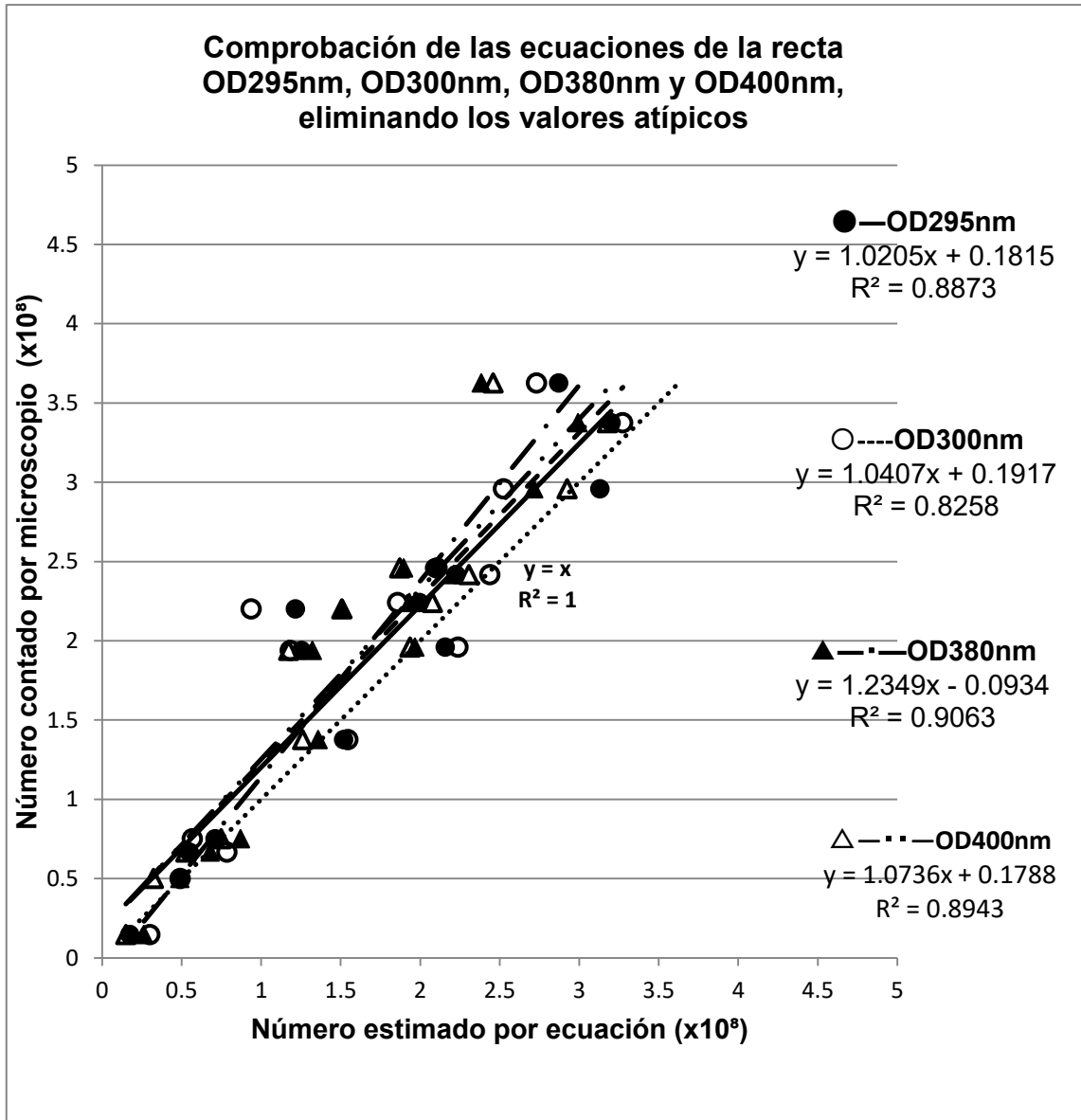


Figura 8: Comprobación de las ecuaciones de la curva de calibración con OD295nm, OD300nm, OD380nm y OD400nm, eliminando los valores atípicos.

Cuadro 11

Análisis de las regresiones lineales utilizando los parámetros intercepto y pendiente, con el 95% de intervalo de confianza

Longitudes de onda	Puntos de análisis	95% Intervalo de confianza	
		LL	UL
OD295nm	Intercepto	-0.20911964	0.58673444
	Pendiente	0.81298096	1.22371464
OD300nm	Intercepto	-0.28796744	0.71709704
	Pendiente	0.76542892	1.30297068
OD380nm	Intercepto	-0.46205672	0.33814072
	Pendiente	1.00220146	1.44801914
OD400nm	Intercepto	-0.19050466	0.57642766
	Pendiente	0.8613867	1.2773771

DISCUSIÓN

Interpretación de los resultados

Se observó que la curva de crecimiento tiene una tendencia ascendente que alcanza su punto más alto en el día 5 y a partir de éste empezó a disminuir el número de leptospiras viables (Figura 1, p24). Las desviaciones estandar de cada día, excepto el día 0, fueron amplias; sin embargo en la comparación entre días utilizando el coeficiente de variación, que permite comparar la variabilidad entre los diferentes días, se consideró adecuado un coeficiente de variación alrededor de 25% para la curva de crecimiento; aunque se observó que en los primeros 3 días el coeficiente de variación superó el 25% (Cuadro 1, p25).

Las curvas de crecimiento basadas en los valores de densidad óptica con las longitudes de onda de 600nm y de 350nm fueron eliminadas debido a que tuvieron las pendientes más bajas y en consecuencia una menor resolución para diferenciar el número de bacterias, aunque para otras bacterias como *Escherichia coli*, la de 600nm es la más adecuada. La de 293nm fue inestable para el ajuste de la línea basal al momento de medir la densidad óptica, por lo

que también fue eliminada. Las longitudes de onda que no fueron eliminadas son 295nm, 300nm de luz ultravioleta y 380nm y 400nm de luz visible (Figura 2, p28). Por otra parte, la relación entre el conteo directo en la cámara de Petroff-Hausser y el conteo por UFC, tuvieron la misma tendencia, pero las UFC en la placa se situaron un logaritmo en base diez debajo del conteo en la cámara de Petroff Hausser, por lo que no se observó la relación de una colonia a partir de una leptospira (Cuadro 2, p31). El conteo de UFC en la placa se basa en el supuesto de que cada bacteria viva se divide para producir una sola colonia. Esto no siempre es cierto porque las bacterias con frecuencia están unidas en cadenas o en grumos. Por consiguiente, a menudo una colonia no se produce como resultado de una sola bacteria, sino de un agregado bacteriano (25). También Larson, et al.1959 mencionan que en el caso de *Leptospira biflexa* tiene tendencia a aglutinarse fácilmente antes de desarrollar las UFC (26). Es probable que esto permita explicar por qué se mantuvo un logaritmo en base diez abajo del conteo directo en la cámara Petroff-Hausser en nuestro estudio. De manera consistente en los resultados del conteo de UFC, aunque un logaritmo en base diez abajo, siempre se mantuvo una relación paralela al número de bacterias determinadas en la cámara.

Fue difícil seleccionar la mejor longitud de onda, con base a la comparación de las R^2 correspondientes a las diferentes longitudes de onda en la curva de calibración, debido a que las R^2 de todas las longitudes de onda resultaron arriba de 0.99 (Figura 4, p33 y Cuadro 3, p34), por lo que se decidió realizar una comprobación de las ecuaciones sobre las longitudes de ondas que no fueron eliminadas (295nm, 300nm, 380nm y 400nm). Considerando el resultado de la gráfica, aparentemente la recta obtenida por la OD295nm tiene la mayor similitud a la recta ideal, donde $y = x$ (Figura 6, p42), sin embargo, por existir una dispersión grande, fue necesario realizar un análisis estadístico para probar que la ecuación obtenida con la OD295nm era adecuada para cuantificar *Leptospira biflexa* sv. Patoc cepa Patoc 1 por espectrofotometría.

El resultado del análisis estadístico, con un 95% de intervalo de confianza, mostró que en ambos datos (los originales y los datos después de la eliminación de los valores atípicos), el intercepto de todas las rectas (OD295nm, OD300nm, OD380nm y OD400nm) tiene posibilidad de pasar por el origen. No obstante, en las pendientes estimadas del modelo de las rectas, la de OD380nm no fue compatible con la hipótesis de que la pendiente es igual a 1. En este estudio se observó que la recta de OD380nm fue la diferente, sin embargo, no es

adecuado eliminar esta longitud de onda, debido a la existencia de una dispersión grande en general. Ésto indica que es difícil señalar la diferencia entre las OD295nm, OD300nm, OD380nm y OD400nm, por ende, no pudimos obtener una sola longitud de onda para cuantificar el número de leptospiras, de manera objetiva y confiable.

Hallazgos relevantes

A pesar de que no se pudo determinar una longitud de onda adecuada, se encontró la posibilidad de cuantificar leptospiras de manera objetiva, confiable y práctica, utilizando espectrofotometría con longitudes de onda de la luz ultravioleta, además de la OD400nm de luz visible que ya se ha utilizado, confirmando una alta correlación entre las lecturas de las OD (295nm, 300nm, 380nm y 400nm) y el número contado por microscopio de campo oscuro. Sin embargo, no se comprobó que las longitudes de onda de luz ultravioleta son más adecuadas que las de luz visible para cuantificar leptospiras por espectrofotometría.

Razonamiento

Con respecto a la utilización de la OD400nm existen varias investigaciones publicadas que la utilizan en la cuantificación de leptospiras, sin embargo, sólo se menciona su uso y no se describe el método (18, 19, 20, 21, 22). En cambio, sobre la utilización de luz ultravioleta, sólo existe una investigación publicada (14). Schreier S., et al. 2009 (14) demostraron una correlación entre el conteo de leptospiras en cámara de Petroff-Hausser y la detección de su ácido desoxirribonucleico (ADN) a OD260nm a partir de cultivos de leptospira diluidas en PBS. Mientras que en nuestra investigación medimos las leptospiras directamente en medio EMJH con luz ultravioleta (OD295nm y OD300nm). Estas dos investigaciones utilizan la luz ultravioleta, tomando en cuenta que la cuantificación tendrá una mayor sensibilidad, cuanto más corta sea la longitud de onda. Por esta razón intentamos cuantificar con una longitud de onda cercana a OD260nm, pero no fue posible, ya que el tipo de muestra no nos permitió utilizar longitudes de onda menores que 293nm, considerando que nuestro objetivo fue cuantificar directamente leptospira en el medio EMJH sin diluir.

La razón por la que es posible utilizar la longitud de onda de la luz ultravioleta (295nm y 300nm) para cuantificar leptospiras por espectrofotometría, está en las características de la muestra, ya que de éstas depende el resultado. Con el espectrofotómetro se puede detectar el valor de absorbancia o el valor de densidad óptica. La diferencia entre estos dos valores se debe al tipo de muestra. Si una muestra es una mezcla homogénea transparente formada por partículas solubles y no genera dispersión de la luz al atravesar la muestra, se usa el término absorbancia; en este caso el detector capta la luz transmitida que no es absorbida por la muestra. En contraste, la densidad óptica es cuando se usa una muestra heterogénea que genera una dispersión de la luz (27, 28). Esto significa que la OD no mide la absorción de la luz por las partículas no solubles sino el grado de dispersión de la luz. Por consiguiente, cuando se mide OD es importante considerar el tamaño y la forma de las partículas que se van a cuantificar. Es común utilizar una longitud de onda de 600nm o 660nm para cuantificar *Escherichia coli* u otras bacterias, no obstante por la morfología de las leptospiras, estas longitudes de onda no son adecuadas. Las leptospiras en general miden 0.1 μm de ancho y 6 a 12 μm de largo (4), en cambio *Escherichia coli* mide 1 μm de ancho y 2 μm de largo (30), por lo que si se usa una longitud

de onda de 600nm para leptospiros, hay menos posibilidad de que la luz choque contra la célula bacteriana ($600\text{nm} = 0.6 \mu\text{m}$) y por esta razón en nuestros resultados de OD600nm se muestra que el valor de OD se queda debajo del 0.1, el cual no permite diferenciar el número de leptospiros; en cambio la OD295nm y OD300nm inciden más en la bacteria por lo que la cantidad de dispersión de la luz aumenta y por lo tanto su valor de OD es mayor y esto aumenta la posibilidad de diferenciar el número de leptospiros.

Adicionalmente las OD295nm y OD300nm mostraron valores ideales dentro del rango de la OD, el cual es de 0.1 a 1.0. El rango de los valores de OD, tanto la absorbancia como densidad óptica se calcula de la misma manera, considerando el porcentaje de transmitancia utilizando la Ley de Lambert-Beer que asume una relación logarítmica inversa entre la cantidad de luz incidente y la transmitida al detector. El problema es que la relación entre el porcentaje de transmitancia y la escala de absorbancia no es proporcional y se genera un error fotométrico. Considerando lo cercanas que están las divisiones de la absorbancia hacia el extremo de la escala correspondiente a valores bajos de transmitancia de un espectrofotómetro, ocasiona que un pequeño error en la lectura de la posición de la aguja en esta zona origine un gran error en la

absorbancia. Análogamente, un pequeño error en la lectura de transmitancia originará un gran porcentaje de error en la absorbancia. Las lecturas de mayor confianza serán las realizadas en la zona media de la escala de transmitancia. Se puede calcular matemáticamente el error relativo que afecta a la concentración resultante, originado por un cierto error de lectura de la posición de la aguja en una escala lineal de transmitancia. La exactitud máxima (respecto a los errores de lectura de la escala) que se obtiene para una lectura de transmitancia es del 36.8%; sin embargo, es aceptable para cualquier lectura de transmitancia entre el 10% y 80%, que sería la absorbancia entre 0.1 a 1.0 (27, 31). En varios artículos y en ésta investigación se mostró que la longitud de onda de 400nm permite una correlación entre OD y número de bacterias, sin embargo, por la consideración del rango ideal entre 0.1 a 1.0, en nuestra curva de calibración la OD295nm y OD300nm son mejores que la OD400nm.

Tomando en cuenta que la sensibilidad mejora cuando la distancia entre las crestas es corta debido a que la cantidad de dispersión de la luz aumenta y que el rango confiable de OD es de 0.1 a 1.0, si se mejora la precisión del experimento utilizando las OD de la luz ultravioleta, hay posibilidad de estimar el número de leptospiras con una mayor aproximación, que con la OD400nm que

actualmente se utiliza.

Limitaciones del estudio

No logramos encontrar diferencia entre las rectas de OD295nm, OD300nm, OD380nm y OD400nm por falta de precisión técnica; por lo tanto, en este momento éste método todavía no se puede llevar a su uso práctico. Sin embargo, si se disminuye la dispersión de los datos, mejorando la técnica del conteo en microscopio de campo oscuro y se aumenta el número de repeticiones, se puede obtener una mayor precisión en la cuantificación de leptospiras por este método. Respecto al número de repeticiones necesarias, se podría calcular estadísticamente el tamaño de la muestra para un estudio subsecuente, considerando el nivel de confianza, la varianza estimada en la población y margen de error ($N = z^2 pq / e^2$).

CONCLUSIONES

1. Se determinó la posibilidad de cuantificar leptospiras de manera objetiva, confiable y práctica, utilizando espectrofotometría con longitudes de onda de la luz ultravioleta (OD295nm y OD300nm); además con longitud de onda de la luz visible (OD400nm) que ya se menciona en algunos artículos, aunque no existe información que sustente su uso.
2. Es necesario obtener precisión a través de mejorar el conteo en microscopio de campo oscuro y realizar un mayor número de experimentos para determinar la longitud de onda adecuada.

REFERENCIAS

1. P.J.Quinn, B.K.Markey, F.C.Leonardo, E.S.Fitzpatrick, S.Fanning, P.J.Hartigan. 2011. Spirochaetes. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 2da edición. Iowa, USA. Wiley-Blackwell. pp 354.
2. Suárez Güemes F, Cervantes Olivares R.A, Jiménez Flores F. 2003. Principales bacterias y hongos asociados al tracto reproductor.En: Manual de prácticas de laboratorio de bacteriología y micología veterinarias. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. D.F. México. pp 106.
3. Secretaria de Salud. Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Leptospirosis. México. 2012.
4. Saito M, Sharon Y. A. M. Villanueva, Masuzawa T, Yanagihara Y, Yoshida S. 2014. Leptospirosis now—the centennial of the discovery of Weil’s disease pathogen. Nihon saikingaku zasshi 69(4): 589-600. (está en japones)
5. Adler B, De la Peña-Moctezuma A. 2010. *Leptospira* and leptospirosis.

- Veterinary Microbiology 140: 287-296.
6. Acha P.N, Szyfres B. 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Tercera edición. Organización Panamericana de la Salud. P175 – P186.
 7. Bourhy P, Collet L, Brisse S, Picardeau M. 2014. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 64: 4061–4067.
 8. [OIE] World Organisation for Animal Health. 2014. Leptospirosis. OIE Terrestrial Manual 2014, Chapter 2.1.9. Disponibilidad: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.09_L_EPTO.pdf. [Consulta: 2015 jun 28]
 9. Chavarría Joya L, Lara Gutiérrez D, Méndez Hurtado W, Moscoso Gama J. 2015. *Leptospira*: revisión del agente causal de una enfermedad zoonótica. Biociencias10(2): 65 – 80
 10. 2013. Leptospirosis. Iowa, Estados Unidos of America. The Center for Food Security & Public Health, Iowa State University. Institute For International Cooperation In Animal Biologics, Iowa State University

College of Veterinary Medicine. Disponible:

<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/leptospirosis-es.pdf>.

[Consulta: 26 feb 2017]

11. Petrakovsky J, Bianchi A, Fisun H, Nájera-Aguilar P, Pereira M.M. 2014.

Animal Leptospirosis in Latin America and the Caribbean Countries:

Reported Outbreaks and Literature Review (2002–2014). International

Journal of Environmental Research and Public Health 11, 10770-1078,

doi:10.3390/ijerph111010770.

12. [PAHO] Pan American Health Organization, [WHO] World Health

Organization. 2017. Leptospirosis. Disponibilidad:

http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id

[=7821%3A2012-informacion-general-leptospirosis&catid=4711%3Alepto](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=7821%3A2012-informacion-general-leptospirosis&catid=4711%3Aleptospirosis-home&lang=es)

[spiro-sis-home&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=7821%3A2012-informacion-general-leptospirosis&catid=4711%3Aleptospirosis-home&lang=es)). [Consulta: 2017 feb 23]

13. Manuel Céspedes Z. 2005. Leptospirosis: Enfermedad zoonótica

reemergente. Rev Peru Med Exp Salud Publica 22(4), Disponibilidad:

<http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v22n4/a08v22n4.pdf>. [Cnsulta: 2016 dic

13]

14. Schreier S, Triampo W, Dounghawee G, Triampo D, Chadsuthi S. 2009.

Leptospirosis research: fast, easy and reliable enumeration of mobile leptospire. Biol Res 42: 5-12.

15. Humberd C, Murray C, Stuart S, Reeb B, Hospenthal D. 2005.

Enumerating leptospire using the coulter counter. Am. J. Trop. Med. Hyg 73(5): pp. 962–963

16. Konishi M, Horiuchi J. 2015. Baio yomoyama banashi. Oosaka daigaku

kougakubu. Seibutsu kougaku kai shi, Osaka Japón, Vol.9 (3): pp 149.

Disponible: https://www.sbj.or.jp/sbj/sbj_vol93_no03.html [consulta: 22 nov 2016] (está en japonés).

17. Lañez E. 2005. Microbiología general. [actualización: 9 may 2005]

Granada, España. Departamento de Microbiología, Universidad de Granada.

Disponible:

https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/12crecimiento.htm#_Toc58934

322. [consulta: 22 nov 2016]

18. Ellinghaus H. 1973. Growth temperatures, virulence, survival, and nutrition

of leptospire. Journal of Medical Microbiology 6 : 487-497,

DOI:[10.1099/00222615-6-4-487](https://doi.org/10.1099/00222615-6-4-487)

19. Wong-ekkabut J, Chadsuthi S, Triampo, Dounghawee G, Triampo,

- Krittanaï C. 2009. Leptospirosis research: Response of pathogenic spirochete to ultraviolet-A irradiation. *African Journal of Biotechnology* 8 (14) : pp. 3341-3352, doi: 10.5897/AJB09.560.
20. Tchamedeu Kameni A.P, Couture-Tosi E, Saint-Girons I, Picardeau M. Inactivation of the Spirochete recA Gene Results in a Mutant with Low Viability and Irregular Nucleoid Morphology 184(2): p. 452–458. doi: 10.1128/JB.184.2.452–458.2002 Jan. 2002.
21. Stoddard R, Bui D, Haberling D, Wuthiekanun V, Thaipadungpanit J, Hoffmaster A. 2014. Viability of *Leptospira* Isolates from a Human Outbreak in Thailand in Various Water Types, pH, and Temperature Conditions. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 91(5) : pp. 1020–1022, doi:10.4269/ajtmh.13-0748.
22. Fernández Esperón I.M, 2016. Validación de un método alternativo para la determinación de la concentración celular en muestras de *Leptospira interrogans*. [tesis]. Universidad Habana, Facultad de Biología, Instituto FINLAY. Disponibilidad: www.scriptorium.uh.cu/.../Iris%20Mariela%20Fernández%20Esperón%20Q [consulta: 31 oct, 2016].

23. Murray G, King A, Srikram A, Sermswan R, Adler B. 2010. Use of Luminescent *Leptospira interrogans* for Enumeration in Biological Assays. *Journal Of Clinical Microbiology* 48(6), 0095-1137. doi:10.1128/JCM.02541-09.
24. Carleton DeTar. 2002. Physics 6730 Jackknife Error Estimates. Disponible: <http://www.physics.utah.edu/~detar/phyics6730/handouts/jackknife/jackknife/>. [consulta: 16 mar 2017]
25. Tortora G. J., Funke B. R., Case C. L. 2007. El control de crecimiento microbial. *Introducción a la Micorbiología*. Editorial médica panamericana. p: 181.
26. Larson A, Treick R, Edwards C, Cox C. 1959. Growth studies and plate counting of leptospire. *Journal of Bacteriology* 77(3): 361–366.
27. Koike H. 2009. Principles of spectrophotometry and measurement of action spectra and quantum yield. Hokkaido University, Teion kagaku Vol.67 (2009) : pp.431-447.
28. Widdel F. 2010. Theory and Measurement of Bacterial Growth. [actualización: 05 June, 2010]. Universidad Bremen, Aleman. Disponible: <http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/31475166/BAterial>

growth_01.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAJ56TQJRTWSMTNPEA&Expires=1478217786&Signature=9UtC5KvQjoUUERDjQC0EsSIP%2B%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DBAterial_growth_01.pdf [consulta: 01 sep, 2016].

29. La Asociación Nacional de Maestros de Ciencias de la Tierra. 2012.

Ventanas al Universo, Longitud de onda. Disponible:

http://www.windows2universe.org/physical_science/basic_tools/wavelength.html&lang=sp [consulta: 28 oct 2016]

30. A. Puerta-García A, Mateos-Rodríguez F. 2010. Enterobacterias Unidad

de Enfermedades Infecciosas. Servicio de Medicina Interna. Complejo

Hospitalario Universitario de Albacete. Albacete. España. Medicine

10(51):3426-31

31. Walton H, Reyes J. 2005. Análisis químico e instrumental moderno.

Barcelona, España : Editorial Reverté, S.A.