



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

01674  
23

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CLONACION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE LOS  
GENES DE TRANSPOSASA Tn5,  $\beta$ -LACTAMASA Y  
CUTINASA A PARTIR DE *Leptospira interrogans*  
SEROVARIEDAD *icterohaemorrhagiae*.

294509

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL  
P R E S E N T A :  
M.V.Z. ERNESTO ARMANDO RODRIGUEZ REYES

TUTOR: DR. ALEJANDRO DE LA PERA MOCTEZUMA

COMITE TUTORAL: DRA. CAMILA ARRIAGA DIAZ

DR. JUAN GARZA RAMOS

DR. FRANCISCO J. TRIGO TAVERA

DR. ANTONIO VERDUGO RODRIGUEZ



MEXICO, D.F.,

JUNIO DE 2001



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 MI MAESTRO EN EL POSGRADO Y DIRECTOR DE TESIS, DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ, PORQUE GRACIAS A SU CONFIANZA Y SU GRAN APOYO INCONDICIONAL DESDE EL INICIO DEL PROYECTO HASTA SU CULMINACIÓN, ES QUE ME HA SIDO POSIBLE PRESENTAR ESTE TRABAJO POR ESCRITO.**

**TOÑO, TE AGRADEZCO DE UNA FORMA ESPECIAL TU CONFIANZA, TUS CONSEJOS SIEMPRE SABIOS Y TU PACIENCIA. ¡ESTE LOGRO ES GRACIAS A TI!**

**A MIS PAPÁS EMILIO RODRÍGUEZ GONZÁLEZ Y MARÍA REYES CHOREÑO, PORQUE PASE LO QUE PASE NUNCA PIERDEN LA CONFIANZA EN MI Y SIMPRE ESTAN CONMIGO.**

**A TODOS AQUELLOS SERES QUE SIEMPRE HAN CREIDO EN MI, Y QUE CON SUS PALABRAS DE ALIENTO, MOTIVACIÓN, ENTUSIASMO Y BUENOS DESEOS ME HAN AYUDADO ENORMEMENTE. NO MENCIONO NOMBRES PORQUE EN VERDAD SERÍA UNA PENA OLVIDAR A ALGUIEN IMPORTANTE. LO DIGO DE VERDAD, CONSIDÉRENSE PARTICIPES TODOS AQUELLOS QUE LO HAN HECHO, A TODOS USTEDES, ¡MUCHAS GRACIAS!**

**A TODOS LOS QUE NO HAN CREIDO EN MI CON APRECIO.**

**SINCERAMENTE  
ARMANDO.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**AL DR. ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA MI OTRO MAESTRO QUIEN PENSO EN MI Y ME APOYO PARA INICIAR MI PROYECTO DE MAESTRÍA. GRACIAS POR COLOCAR LA SEMILLA EN TIERRA FÉRTIL. Y NO SOLO POR ESO, USTED SABE QUE LO APRECIO BASTANTE Y QUE LA FORMACIÓN QUE TENGO COMO BACTERIÓLOGO, LEPTOSPIROLOGO, CLÍNICO DE PEQUEÑAS ESPECIES Y OTROS ASPECTOS DE LA VIDA HA SIDO GRACAS A USTED. GRACIAS MAESTRO.**

**AL MAESTRO EN BIOLOGÍA MOLECULAR RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO POR SU VALIOSÍSIMA COLABORACIÓN PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE PROYECTO DE MAESTRIA, LABOR QUE TE AGRADEZCO Y RECONOZCO PÚBLICAMENTE, YA QUE HAS SIDO UNA PIEZA FUNDAMENTAL EN ESTE TRABAJO. GRACIAS RIGO.**

**A MI DIRECTOR DE TESIS QUIEN SIEMPRE ESTUVO CERCA DE MI EN LOS EXPERIMENTOS Y CON SUS CONSEJOS, SUGERENCIAS Y OBSERVACIONES HA SIDO POSIBLE LLEGAR A TERMINO ESTE TRABAJO.**

**AL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y A TODOS LO QUE EN UN MOMENTO DADO HAN FORMADO PARTE DEL EQUIPO DE TRABAJO, YA QUE GRACIAS A LA INFRAESTRUCTURA Y EQUIPO DE ESTE LABORATORIO ASI COMO AL APOYO DE LA GENTE QUE SE FORMA AQUÍ TUVE SIEMPRE LAS MEJORES CONDICIONES PARA REALIZAR MIS EXPERIMENTOS Y ASI COMO YO HE DISFRUTADO TRABAJAR AQUÍ, HABRA MAS ESTUDIANTES QUE LO HARÁN Y CON LAS MEJORES CONDICIONES PARA LOGRAR LOS MEJORES RESULTADOS.**

**AGRADEZCO LA DISTINCIÓN DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO MEDIANTE LA BECA QUE ME OTORGO, MISMA QUE ME PERMITIÓ REALIZAR LOS ESTUDIOS DE MAESTRIA Y FUE UN GRAN APOYO EN ESE PERIODO.**

**AGRADEZCO A LOS ACADÉMICOS QUE FORMARON PARTE DE MI COMITÉ TUTORAL Y A LOS MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN, YA QUE CON SUS OBSERVACIONES, CONSEJOS Y SUGERENCIAS, FUE POSIBLE LLEVAR A TERMINO ESTE TRABAJO.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**AGRADEZCO AL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, LA OPORTUNIDAD QUE ME HA BRINDADO DE UNA FORMACIÓN ACADEMICA, COMO BACTERIÓLOGO, COMO LEPTOSPIROLOGO Y PERMITIRME UN ACERCAMIENTO MAYOR AL MUNDO DE LA INVESTIGACIÓN Y DE LA CIENCIA. ESTE LUGAR LO HE CONSIDERADO MI SEGUNDA CASA DESDE MAYO DE 1990.**

## **NO DESISTAS**

**Cuando vayan mal las cosas  
Como a veces suelen ir  
Cuando ofrezca tu camino solo  
Cuestas que subir  
Cuando ya el dolor te agobie  
Y no puedas ya sentir**

**Y precise sonreír aun teniendo que llorar**

**DESCANSAR A CASO DEBES PERO NUNCA DESISTIR**

**Cuando vayan mal las cosas  
Como a veces suelen ir  
Cuando ofrezca tu camino solo  
Cuestas que subir**

**DESCANSAR A CASO DEBES PERO NUNCA DESISTIR.**

**Y no es dado a tu ignorancia  
Alcanzar el bien que anhelas  
Y que piensas tan lejano  
Tras las sombras de la duda  
Ya plantadas ya sombrías  
Puede bien surgir el triunfo  
No el fracaso que temías**

**ESFUÉRZATE, TU PUEDES, NO DESISTAS.**

**Cuando mal vayan las cosas  
Más debemos insistir  
Descansar a caso debes  
Pero nunca desistir**

**NO DESISTAS, NO DESISTAS, NO DESISTAS.**

**“Como es arriba es abajo y como es abajo es arriba”**

## INDICE

<b>I. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODICCION</b>	<b>3</b>
Taxonomía de las leptospiras.	3
Leptospirosis en México.	5
Vía de entrada y mecanismos de transmisión.	7
Manifestaciones clínicas en animales domésticos.	8
Características generales del género <i>Leptospira</i> .	9
Hábitat.	9
Componentes estructurales y antigénicos.	10
Factores físicos y químicos que influyen en el crecimiento de las leptospiras.	11
Temperatura.	11
Potencial de hidrógeno (pH).	11
Salinidad.	11
Potencial de óxido-reducción.	11
Fuentes de carbono.	11
Fuentes de nitrógeno, purinas y pirimidinas.	12
Otros nutrimentos requeridos por las leptospiras.	12
Metabolismo.	12
Crecimiento.	12
Determinantes de virulencia.	13
Adhesión.	13
Persistencia en sitios privilegiados.	13
Toxicidad.	14
Autoinmunidad.	15
Quimiotaxis hacia la hemoglobina.	15
Presencia de plásmidos.	16
La transferencia de información genética contribuye a la evolución, la heterogeneidad y a la adquisición de genes de virulencia.	16
Genes reportados en el género <i>Leptospira</i> .	18
Diagnóstico.	18

Las herramientas moleculares son una alternativa para el diagnóstico de enfermedades como la leptospirosis.	20
Terapia con antibióticos.	20
<b>III. HIPOTESIS.</b>	<b>22</b>
<b>IV. OBJETIVOS.</b>	<b>22</b>
<b>V. MATERIAL Y METODOS.</b>	<b>23</b>
Producción de un antisuero policlonal contra <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad <i>icterohaemorrhagiae</i> .	23
Adsorción del antisuero policlonal.	24
Extracción de ADN cromosomal.	25
Construcción del banco genómico de expresión.	27
Titulación del banco genómico de expresión.	27
Selección de clonas recombinantes.	35
Escisión <i>in vivo</i> del fagémido pBK-CMV.	38
Extracción de ADN de los fagémidos recombinantes.	40
Análisis de restricción.	41
Purificación del ADN clonado de <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad <i>icterohaemorrhagiae</i> .	41
Secuenciación de nucleótidos.	43
Análisis de la secuencia.	43
<b>VI. RESULTADOS.</b>	<b>44</b>
<b>VII. DISCUSIÓN.</b>	<b>70</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES.</b>	<b>80</b>
<b>IX. LITERATURA CITADA.</b>	<b>81</b>



## RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa y contagiosa que afecta tanto especies de animales domésticos como silvestres y además es transmisible de los animales al hombre, el cual es considerado como un huésped accidental. Esta enfermedad es causada por bacterias patógenas del género *Leptospira* y es una de las zoonosis más importantes en el mundo. Con la finalidad de aislar y caracterizar genes de *Leptospira interrogans* serovariedad *icterohaemorrhagiae* asociados al proceso de infección, se construyó un banco genómico de expresión con la cepa RGA, utilizando como vector de clonación al fago  $\lambda$  ZAP EXPRESS.

Utilizando un antisuero policlonal producido en conejo contra la serovariedad *icterohaemorrhagiae*, se logró el aislamiento de clones recombinantes.

Se seleccionaron 12 clones, 01'<sub>111</sub>, X'<sub>111</sub>, X'<sub>121</sub>, 1a''<sub>111</sub>, 2b''<sub>313</sub>, 3b''<sub>111</sub>, 3c'''<sub>231</sub>, 3c''<sub>211</sub>, 3c''<sub>6</sub>, 7a''<sub>111</sub>, 3b''<sub>11</sub>, 3b''<sub>12</sub> las cuales fueron subclonadas en el fagémido pBK-CMV generándose así los fagémidos recombinantes pART1, pART2, pART3, pART4, pART5, pART6, pART7, pART8, pART9, ART10, ART13 y ART18.

Se seleccionó al azar al fagémido ART9 el cual contenía un fragmento de ADN de *L. icterohaemorrhagiae* de aproximadamente 2500 pb con la finalidad de secuenciarlo. El análisis de la secuencia reveló la presencia de tres marcos abiertos de lectura (MAL) incompletos. En la dirección 3' del fragmento se localizó un codón de término de la traducción TGA en la posición 354, mostrando el posible MAL I incompleto de 356 pb, que codifica para una proteína de 95 aminoácidos (aa). Comparando la secuencia de aa de este MAL I con la base de datos del Banco de Genes (*GenBank*), se encontró una identidad del 99% y una similitud del 99% con una transposasa Tn5. En la misma dirección se localizó un codón de término de la traducción TGA en la posición 143, mostrando el posible MAL II incompleto de 602 pb, que codifica para una proteína de 200 aa. Este MAL II mostró una identidad del 85% y una similitud del 85% con la enzima cutinasa de *Phytophthora capsici*. En dirección 5' se localizó un codón de término de la traducción TAA en la posición 144, mostrando un posible MAL III incompleto de 189 pb, que codifica para una proteína de 46 aa. Este MAL III incompleto reveló una homología con una  $\beta$ -lactamasa resistente a inhibidores TEM-79 de *E. coli*, observándose una identidad del 100% y una similitud del 100%. Será necesario finalizar la secuenciación de estos genes así como las respectivas regiones reguladoras, con la finalidad de caracterizar sus funciones biológicas.

Este trabajo de investigación fue financiado por los Proyectos: PAPIIT IN503995, CONACyT 1122PB Y PAPIIT IN211598.

## SUMMARY

Leptospirosis is an infectious and contagious disease that affects domestic as well as wild animals. It is also transmitted from animals to man, being the latter an accidental guest. The disease is caused by pathogen bacteria from the genus *Leptospira*, and it is considered one of the most important zoonosis in the world. In order to isolate and characterize genes of *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*, associated to the infectious process, a genomic library was constructed using the strain RGA, and the phage  $\lambda$  ZAP EXPRESS as a cloning vector.

The isolation of recombinant clones was performed using a polyclonal rabbit antiserum against the serovar *icterohaemorrhagiae*. Twelve clones were selected and then, subcloned in the pBK-CMV phagemide, with the purpose to obtain recombinant phagemids, the recombinant phagemides were designated as ART phagemids. The phagemide ART9 containing a DNA fragment of serovar *icterohaemorrhagiae* of 2,500 bp was randomly selected and sequenced. In the 3' direction the sequence analysis revealed the presence of three incomplete open reading frames (ORF). A stop codon TGA was revealed at 354 position, showing the possible incomplete ORFI of 356 bp, that encodes for a 95 amino acid (aa) protein. After a *Gene Bank data* search ORFI was found to have 99% identity and a 99% similarity with a Tn5 transposase. At the same direction, a stop TGA codon was found at position 143, that encodes for a 200 aa protein, suggesting a possible 602 bp incomplete ORFII. This ORFII showed an 85% identity and similarity whit the gene that encodes for the cutinase enzyme of *Phytophthora capsici*. In the 5' direction a stop codon TAA was located at the position 144, showing a possible incomplete ORFIII, of 189 bp, that encodes for a 46 aa protein. This incomplete ORFIII revealed an homology with a  $\beta$ -lactamase that resist inhibitors TEM-79 of *Escherichia coli*, observing a 100% identity and 100% similarity. It will be necessary to complete the sequencing of those genes and the respective regulation regions, in order to characterize the biological roles.

## CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LOS GENES DE TRANSPOSASA Tn5, $\beta$ -LACTAMASA Y CUTINASA A PARTIR DE *Leptospira interrogans* SEROVARIEDAD *icterohaemorrhagiae*.

### INTRODUCCIÓN.

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa y contagiosa causada por bacterias patógenas del género *Leptospira*, la cual tiene una amplia distribución tanto en especies de animales domésticos como en animales silvestres y además es importante por su transmisibilidad hacia el hombre, el cual es considerado como un huésped accidental.<sup>1</sup> La leptospirosis en los animales y el hombre es considerada la zoonosis más difundida, aunque por lo general se manifiesta localmente como infección endémica o esporádica. Se ha planteado la hipótesis de que todas las especies conocidas de roedores, marsupiales y mamíferos podrían actuar como portadores y excretores de leptospiras. Recientemente se han descrito más animales excretores, entre los que destacan leones marinos, camellos, monos y reptiles.<sup>2,3</sup>

Los **huéspedes de mantenimiento** (reservorios) son aquellos en los cuales el ciclo de infección es perpetuado entre la misma especie animal por transmisión directa. Este tipo de huéspedes se caracteriza por la eliminación constante de leptospiras. Otros animales de la misma o diferente especie pueden llegar a ser infectados por transmisión indirecta; ellos son frecuentemente **huéspedes accidentales** o incidentales, en los cuales la excreción de leptospiras es autolimitante o de corta duración, terminando así una vez que los animales son retirados de la fuente de exposición.<sup>2</sup>

### Taxonomía de las leptospiras.

Dentro del orden de los Spirochaetales se encuentra la familia Leptospiraceae, la cual comprende a los géneros *Leptonema*, *Turneria* y *Leptospira*. De acuerdo con la clasificación antigénica, el género *Leptospira* está constituido por dos especies:

1.- *L. interrogans* la cual agrupa a 223 serovariedades de *Leptospira* en 25 serogrupos, todas ellas patógenas para los animales y el humano (Cuadro 1).<sup>4</sup>

2.- *L. biflexa* la cual comprende a 60 serovariedades de leptospiras saprófitas que no son patógenas para los animales ni para el humano.<sup>4</sup>

**Cuadro 1. Lista de los serogrupos de *Leptospira interrogans* reconocidos hasta el momento.**

<b>Número</b>	<b>Serogrupo</b>
1	Australis
2	Autumnalis
3	Ballum
4	Bataviae
5	Canicola
6	Celledoni
7	Cynopteri
8	Djasiman
9	Grippotyphosa
10	Hebdomadis
11	Icterohaemorrhagiae
12	Javanica
13	Lousiana
14	Lyme
15	Manhao
16	Mini
17	Panama
18	Pomona
19	Pyrogenes
20	Ranarum
21	Sermin
22	Sejroe
23	Shermani
24	Tarassovi
25	Aún no designado

\* Tomado del Instituto Pasteur: <http://www.pasteur.fr/Biol/Leptospira/Interrogans.html> 2001.

Recientemente, mediante el uso de reacciones de hibridación con sondas de ADN y análisis de restricción del cromosoma, se ha demostrado una considerable heterogeneidad entre leptospiros patógenas, de tal manera que la especie *interrogans* está ahora dividida en 7 genoespecies: *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai* y *L. weilii*.<sup>5,6</sup> De igual forma, la especie *biflexa* que agrupa leptospiros no patógenas, comprende 3 nuevas genoespecies: *L. biflexa*, *L. meyeri* y *L. wolbachii*.<sup>5</sup>

### **Leptospirosis en México.**

Más de la mitad de los países y territorios del mundo han informado haber aislado una o más de las serovariedades existentes de *L. interrogans*, y en algunos otros hay evidencias serológicas de su presencia, por lo que puede suponerse que se encuentra esperando para ser descubierta en el resto del mundo,<sup>7</sup> hace más de 20 años de esta publicación y todavía sigue vigente.<sup>8</sup> En México, todavía no se ha descrito el lugar que ocuparía la leptospirosis dentro del panorama epidemiológico nacional. Al revisar el boletín semanal que emite el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de los años de 1996 a julio de 1997 se reporta la seroprevalencia e incidencia de fiebre tifoidea, paratifoidea, salmonelosis, candidiasis, escarlatina, SIDA, cólera y conjuntivitis entre otras, pero no se encuentra ningún reporte de prevalencia o incidencia de leptospirosis.<sup>8</sup>

Los primeros estudios de la enfermedad en bovinos se realizaron en 1962, utilizando la prueba de aglutinación microscópica (AM) en campo oscuro.<sup>9</sup> Se ha demostrado la transmisión experimental de leptospiros en algunos artrópodos (garrapatas y piojos) sin embargo, no son considerados vectores importantes.<sup>2</sup> De cualquier forma, en 1972, al estudiar la situación de la leptospirosis con base en estudios serológicos, se consideró a ciertos artrópodos en la epidemiología de la enfermedad.<sup>10</sup>

En México la importancia económica así como de salud pública de la leptospirosis es sin lugar a dudas relevante, como lo hace constar el sin número de publicaciones nacionales al respecto.<sup>11</sup> El porcentaje de seropositividad en los sueros humanos coincide en la mayoría de las diferentes investigaciones manteniéndose durante todas estas décadas entre 14 y 16% en las poblaciones abiertas.<sup>8</sup> En humanos, la serovariedad *L. canicola* destaca como la serovariedad más importante sin descartar a otras como *L. icterohaemorrhagiae*, *L. gryppotyphosa* y *L. pomona*.<sup>12,13</sup> Grupos ocupacionales en riesgo son los médicos veterinarios, trabajadores de granjas dedicadas a la producción de cerdos, de establos,

rastros y todos aquellos que tengan contacto directo o indirecto con animales.<sup>12,13</sup> Las inundaciones son un factor predisponente importante como se reportó en un brote de leptospirosis humana que se presentó en Nicaragua.<sup>8</sup>

Durante el periodo de 1996 a 1998 el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) recibió un total de 3251 muestras de suero de humanos, procedentes de varios estados de la República Mexicana, mismas que fueron procesadas para realizar la técnica de AM con la finalidad de establecer un diagnóstico de leptospirosis. Del total de muestras remitidas, 753 (23%) resultaron positivas a las siguientes serovariedades:

417 (55.4%) contra *L. canicola*

229 (30.4 %) contra *L. pomona*

107 (14.2%) contra *L. icterohaemorrhagiae*.

Durante este período de análisis se notificó el fallecimiento de tres personas infectadas, de las cuales, una presentaba un problema de inmunodeficiencia. Es importante hacer mención que la mayoría de los casos detectados han sido provocados por contacto directo con animales infectados. Así mismo, se demostró un incremento del número de casos durante los meses de octubre, noviembre y diciembre. En este estudio la mayoría de los casos positivos correspondían al estado de Tabasco, y en segundo lugar el Distrito Federal.<sup>14</sup>

Recientemente se determinó la presencia de anticuerpos contra diferentes serovariedades de *Leptospira interrogans* en diferentes poblaciones de leones marinos (*Zalophus californianus californianus*), localizados en siete islas del Golfo de California. La población humana en riesgo se reduce a pescadores del lugar, los cuales, visitan éstas islas y en donde la transmisión de leptospirosis podría presentarse a través de una fuente indirecta de infección.<sup>3</sup>

Por otro lado, resulta preocupante que en la actualidad la leptospirosis humana llegue a confundirse con enfermedades como hepatitis y dengue hemorrágico debido a que existe un desconocimiento de la enfermedad entre la población de médicos cirujanos, razón por la cual, el apoyo del laboratorio para establecer un diagnóstico preciso de enfermedades con cuadros clínicos similares de vital importancia.

En un estudio diferencial entre leptospirosis y dengue hemorrágico realizado por el INDRE a partir de casos con cuadro clínico ictero-hemorrágico se determinó que de 351 muestras de suero procedentes de pacientes negativos a dengue el 14% de las muestras (50) reaccionaron positivamente contra *L. interrogans*, detectándose anticuerpos contra tres diferentes serovariedades diferentes:

31 (62%) contra *L. pomona*.

14 (28%) contra *L. canicola*.

5 (10%) contra *L. icterohaemorrhagiae*.

Estos resultados confirman la presencia de la leptospirosis en cuadros ictero-hemorrágicos y la importancia del laboratorio en la confirmación del diagnóstico clínico, ya que desde el punto de vista médico, el tratamiento y manejo de estas enfermedades con cuadro clínico similar es totalmente diferente.<sup>15</sup>

### **Vía de entrada y mecanismos de transmisión.**

A pesar de años de especulación, la ruta y modo de entrada de las leptospiras en la infección natural no está descrita al detalle. Se ha establecido que las leptospiras pueden entrar a través de pequeñas abrasiones en la piel y que pueden entrar directamente a la vía sanguínea o linfática a partir de la mucosa conjuntival, mucosa del tracto genital, mucosa de la cavidad oral y mucosa nasofaríngea. Por otro lado, se ha establecido como poco probable que ocurra la penetración a través de piel intacta o por otros sitios anatómicos. Animales o humanos infectados eliminan a las leptospiras principalmente a través de la orina.<sup>2</sup>

Los humanos adquieren la infección cuando éstos tienen un contacto muy estrecho con diferentes especies de animales domésticos infectados o cuando realizan sus actividades dentro de territorios donde habitan diversas especies de animales silvestres y roedores (reservorios naturales), y tienen contacto con riachuelos, charcos, abrevaderos y lodo contaminados con la orina de éstos animales, los cuales eliminan leptospiras patógenas en forma normal.

El papel que juega la fauna nociva en las zonas urbanas como transmisores de leptospiras es de gran importancia en la diseminación de la enfermedad. Roedores estrechamente relacionados con el hábitat del ser humano tales como la rata negra y la rata noruega

(*Rattus rattus* y *Rattus norvegicus*), así como el ratón común (*Mus musculus*) pueden actuar como fuente de leptospiras para el ser humano, perros y otras especies de animales, debido a su amplia distribución en zonas urbanas y rurales.<sup>16</sup>

En estudios realizados con roedores, se ha visto que la rata negra es el huésped de mantenimiento para el serogrupo Ballum de *L. interrogans*, mientras que la rata noruega se comporta como huésped de mantenimiento para el serogrupo Icterohaemorrhagiae, mismo serogrupo que es comúnmente detectado en el hombre. De igual forma, se demostró que en la rata negra urbana madura, es aproximadamente cuatro veces mayor la probabilidad de que porte leptospiras en comparación con las ratas negras inmaduras, mientras que a nivel de campo la relación fue de dos veces; y en la rata noruega fue cerca de tres veces más común la infección de los animales maduros que en los inmaduros tanto a nivel de campo como en las zonas urbanas.<sup>17</sup>

### **Manifestaciones clínicas en animales domésticos.**

En especies productivas entre las que se incluyen, en orden de importancia: bovinos, cerdos, ovinos y caprinos, las pérdidas económicas originadas por la leptospirosis se traducen en la presentación de abortos, baja en la producción láctea y muertes de animales jóvenes.<sup>18</sup> Siendo los bovinos la especie animal más comúnmente afectada por *L. interrogans*, con una mayor severidad, la serovariedad *hardjo bovis* ha sido la más comúnmente asociada con esta especie. Así mismo, estimaciones basadas en estudios serológicos indican prevalencias que van del 15 hasta el 60% en bovinos de México.<sup>19</sup>

Los perros son la especie animal con mayor relación con el hombre por lo cual se convierten también en una de sus principales fuentes de infección. *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *L. canicola* han sido dos de las serovariedades más comúnmente asociadas con esta especie, en la cual, se considera que la mayoría de los casos cursan en forma subclínica, siendo mayor el número de perros con títulos positivos a *Leptospira interrogans* que el número de perros que son diagnosticados clínicamente con la enfermedad. En los perros son considerados tres principales síndromes : urémico, icterico y hemorrágico, con signos clínicos que van desde fiebre de origen desconocido y anorexia, hasta vómito y diarrea con sangre, estomatitis ulcerativa, ictericia, hematuria, hemoglobinuria y signos nerviosos entre otros. La signología varía ampliamente dependiendo de la serovariedad, la edad, estado nutricional, fisiológico e inmunológico del perro, la dosis



infectante y de diferentes factores ambientales. Lo que es un hecho es que éstas son dos de las serovariedades comúnmente detectadas en el humano.<sup>20,21,22,23,24,25</sup>

La gran diversidad de signos y síntomas presentes durante la enfermedad en los animales, derivan en la presentación de cuadros subclínicos o bien a un estado de portador que enmascaran y complican la evaluación clínica de los animales afectados. Por otro lado, la reconocida dificultad en el aislamiento del agente etiológico hace necesario el uso de la combinación de diversos métodos (clínicos, microscópicos, serológicos y bacteriológicos) para emitir un diagnóstico acertado.<sup>1,18,26</sup> Tales métodos suelen ser imprecisos, subjetivos y ocasionalmente lentos, razones por la cuales se están buscando alternativas diagnósticas.<sup>1,26</sup>

### **Características Generales del género *Leptospira*.**

Observadas bajo el microscopio de campo oscuro, las leptospiras son microorganismos delgados, helicoidales y móviles que miden 0.1  $\mu\text{m}$  de diámetro y de 6 a 20  $\mu\text{m}$  de longitud con ganchos en uno o ambos extremos, no presentan cápsula y no producen esporas. Se ha relacionado la ausencia de ganchos con la pérdida de virulencia en cepas cultivadas *in vitro*, aunque formas virulentas sin ganchos han sido reportadas.<sup>27</sup>

Mediante la tinción de Gram, las leptospiras se tiñen débilmente y son difíciles de distinguir, por lo que pueden ser teñidas para su visualización mediante tinción de Giemsa, tinciones argénticas aplicadas a tejidos, inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa. Así mismo se ha demostrado que técnicas moleculares como la hibridación *in situ*, permiten observar a las leptospiras intactas.<sup>28</sup>

### **Hábitat.**

Las leptospiras son bacterias acuáticas, móviles, cuyo hábitat natural es la orina de animales infectados o animales reservorios naturales (zorrillos, conejos, mapaches, tlacuaches, venados, ratas, venados, zorros, lobos, serpientes entre otros), aguas estancadas, lodo y todo tipo de ambientes acuáticos contaminados con orina conteniendo leptospiras. La estructura del suelo y subsuelo son importantes para la supervivencia de leptospiras en periodos de sequía. Las leptospiras patógenas muestran una gran adaptabilidad ante los constantes cambios a los que se enfrentan, tales como características del suelo, salinidad del agua, temperatura de animales febriles, condiciones de los túbulos renales y vejiga.<sup>2</sup>

## Componentes Estructurales y antigénicos.

Estructuralmente, las leptospiras están constituidas por una envoltura externa comparable a la membrana externa de las bacterias Gram negativas, la cual se compone de moléculas de proteína, lípidos y lipopolisacárido (LPS), una capa de peptidoglicano con un componente característico, ácido  $\alpha,\epsilon$ -diaminopimélico y una membrana citoplasmática.<sup>2</sup> Entre la membrana externa y el peptidoglicano se encuentra el espacio periplásmico, sitio en donde se ubican dos endoflagelos de doble banda los cuales se insertan en ambos polos a través del complejo peptidoglicano, de ahí avanzan a todo lo largo de la bacteria y rara vez cruzan la región central. Los endoflagelos dan una consistencia sólida a la bacteria y son los responsables de la movilidad característica de las leptospiras.<sup>29,30</sup>

El LPS es el principal componente antigénico hacia el cual se dirigen los anticuerpos aglutinantes y casi sin excepción, los antígenos inmunoreactivos son similares o derivados del LPS. El *core* (región central del LPS) contiene ramnosa y los genes que codifican para la síntesis de este azúcar ya han sido caracterizados.<sup>31</sup> El efecto de la respuesta inmune hacia el LPS conduce a la destrucción de la cubierta externa y la pérdida de la integridad del microorganismo.<sup>32</sup>

Varios oligosacáridos incluyendo azúcares fosforilados y aminoazúcares comprenden los epítopes de las cadenas externas confiriendo especificidad serológica e inmunidad.<sup>33</sup> Por lo tanto, se asume que el mosaico antigénico sobre la superficie de las leptospiras difiere tanto cuantitativa como cualitativamente de cepa a cepa, resultando así en la seroespecificidad; reacciones con anticuerpos monoclonales sostienen este punto.<sup>34</sup>

Además de los antígenos a base de carbohidratos, varios antígenos proteicos han sido descritos. Mediante el tratamiento con un detergente no iónico (Tritón X-100) se produce un antígeno proteico de 62 kDa reactivo contra 24 cepas de *Leptospira* por fijación de complemento, inmunodifusión y ELISA.<sup>35</sup> Esta proteína tiene todas las características de un antígeno común GroE, proteína de choque térmico.<sup>36</sup> Por otro lado, se ha identificado una proteína de superficie de 31 kDa, (OmpL1) en la membrana externa, esta proteína se encuentra más densamente distribuida en cepas virulentas que en cepas avirulentas.<sup>37</sup>

## **Factores Físicos y Químicos que influyen en el crecimiento de las leptospiras.**

### **Temperatura.**

Las leptospiras, tanto patógenas como no patógenas crecen *in vitro* en un intervalo de temperatura óptimo de 28 a 30°C con temperaturas extremas de 11 a 42°C. Se ha propuesto el crecimiento a temperaturas de 11 a 13°C como una prueba fenotípica para identificar a *L. biflexa*, la cual tiene la capacidad de crecer a esta temperatura, a diferencia de *L. interrogans* que no crece.<sup>2</sup>

### **Potencial de Hidrógeno (pH).**

Las leptospiras crecen adecuadamente a un pH de 7.2 a 7.6. Mueren en condiciones ácidas con valores de pH menores a 6.5, y por el contrario, toleran mejor la alcalinidad y crecen sin ser afectadas a un pH de 8.4.<sup>2</sup>

### **Salinidad.**

Muchos de los medios para el cultivo de leptospiras contienen una molaridad final de sales de 0.05 M. Las leptospiras halófilas requieren concentraciones del ion sodio de 0.22 – 0.44 M para crecer y pueden tolerar concentraciones por arriba de 0.65 – 0.75 M.<sup>2</sup>

### **Potencial de óxido-reducción.**

Las leptospiras son bacterias aerobias a microaerofílicas que no toleran condiciones de reducción o anaerobiosis. Potenciales de óxido-reducción menores de  $E_h - 0.250$  mV a un pH de 7.2 las afectan.<sup>2</sup>

### **Fuentes de carbono.**

La principal fuente de energía de las leptospiras son ácidos grasos de cadena larga (12 a 18 átomos de carbono) insaturados. *Leptospira biflexa* puede crecer en presencia de ácidos grasos de cadena larga o corta, saturados o insaturados. Es importante considerar para el cultivo *in vitro* que la forma y presentación de los ácidos grasos es crítica ya que éstos son potencialmente tóxicos para las leptospiras. El Tween 80 es ampliamente usado en los medios de cultivo para *Leptospira* como una fuente no tóxica de ácidos grasos. Así mismo,

un destoxicante tal como la albúmina sérica bovina fracción V (ASB-V) en una concentración final del 1.0%, es usada para absorber y liberar ácidos grasos lentamente.<sup>2</sup>

### **Fuentes de nitrógeno, purinas y pirimidinas.**

La única fuente esencial de nitrógeno es el amonio. Algunas cepas de *Leptospira* metabolizan aminoácidos probablemente produciendo amonio por desaminación.

Todas las cepas de *L. biflexa* pueden sintetizar sus propias purinas y pirimidinas. En general, todas las cepas de las genoespecies *L. borgpetersenii*, *L. santarosai* y algunas de *L. interrogans* sintetizan purinas ya que éstas son requeridas para su metabolismo, mientras que todos los grupos patógenos requieren pirimidinas.<sup>2</sup>

### **Otros nutrientes requeridos por las leptospiras.**

Fosfatos, sulfatos, sales de hierro o hemoglobina, calcio y magnesio, tiamina y cianocobalamina son esenciales. Sales de cobre y manganeso también son requeridas.<sup>2</sup>

### **Metabolismo.**

Todas las leptospiras son quimioorganotrofas, aerobias a microaerofílicas y usan O<sub>2</sub> como aceptor final de electrones vía citocromos. Los citocromos a, c y c<sub>1</sub>, catalasa así como oxidasas han sido identificadas. Los ácidos grasos, que son la principal fuente de energía de las leptospiras, son degradados mediante β-oxidación; la producción de ácidos a través de la fermentación de azúcares no ocurre, sin embargo, las principales enzimas requeridas en la vía metabólica de los carbohidratos están presentes. Un componente característico de las leptospiras, el ácido *cis*-11hexadecenoico, es raro en otras bacterias.<sup>2</sup>

### **Crecimiento.**

El crecimiento de todas las cepas de *Leptospira* es lento, ya que el intervalo generacional de las leptospiras bajo condiciones óptimas a una temperatura de 30°C es de 6 a 8 horas. La aereación y agitación de los cultivos incrementan su crecimiento. En cepas adaptadas al cultivo *in vitro* en el laboratorio, el máximo crecimiento puede ser esperado de 3 a 10 días, dependiendo de la cepa y el medio de cultivo utilizados, alcanzándose densidades que van de 10<sup>9.5</sup> a 10<sup>10</sup> leptospiras por ml, con las mejores condiciones de aereación. Por el

contrario, cepas aisladas directamente de fluidos corporales o tejidos tardan en desarrollar de 6 a 8 semanas.<sup>2</sup>

### **Determinantes de Virulencia.**

Es poco lo que se conoce acerca de los factores de virulencia de *Leptospira interrogans* por lo que muchas interrogantes al respecto continúan sin respuesta. La caracterización funcional de los genes relacionados con la virulencia, así como los detalles moleculares de la patogenia han sido poco estudiados. Investigaciones recientes han generado diversas hipótesis para dar una posible explicación sobre algunos de los factores de virulencia de *L.interrogans*. Sin embargo, los estudios futuros deben considerar estos aspectos ya que son necesarios para comprender el desarrollo de la leptospirosis.<sup>2</sup>

A continuación se describen los principales mecanismos mediante los cuales las leptospiras pueden producir daño.

### **Adhesión.**

Experimentos *in vitro* han evidenciado la unión de leptospiras patógenas a células eucarióticas (fibroblastos de ratón L-929, células del epitelio renal), sugiriendo una relación entre adhesión y virulencia.<sup>38</sup> De igual forma, modelos de adherencia *in vitro* han mostrado que la unión específica y la invasión de células epiteliales y endoteliales fueron propiedades observadas en leptospiras virulentas. Así mismo, se demostró un decremento en la adherencia de las leptospiras a las células cuando éstas fueron tratadas con formaldehído, lo cual indica que la viabilidad y la integridad de los componentes externos de las leptospiras es esencial para el proceso de infección.<sup>39</sup>

Micrografías electrónicas han mostrado una interacción directa entre la superficie celular y la envoltura externa de las leptospiras.<sup>40</sup> La relación entre los lípidos o polisacáridos del lipopolisacárido (LPS) leptospiral y los lípidos ubicados en la superficie de la envoltura externa no ha sido investigada. Sin embargo, se ha especulado que la unión a la superficie celular de los túbulos renales se lleve a cabo a través de sus lípidos.<sup>41,42</sup>

### **Persistencia en sitios privilegiados.**

En animales que no murieron de leptospirosis aguda, las leptospiras pueden persistir en un número pequeño en ciertos tejidos, los cuales son sitios inmunológicamente privilegiados.

Estos tejidos incluyen los túbulos renales proximales, cerebro, cámara anterior del ojo y el tracto genital en cerdos, bovinos y probablemente el de otras especies animales. En estos sitios las leptospiras quedan protegidas de los anticuerpos circulantes, pueden persistir y replicarse.<sup>43,44</sup> Las bases de la persistencia a nivel del tracto genital en serovariedades adaptadas al huésped tales como *L. bratislava* en cerdos y *L. hardjo bovis* en bovinos no han sido determinadas. Es posible que estas serovariedades estén protegidas de la opsonización por IgG e IgA local en estos sitios por un mecanismo similar al que permite a *Campylobacter fetus* persistir en el tracto genital del ganado bovino. Algunas de las explicaciones postuladas consideran que dicha persistencia puede estar relacionada con una baja antigenicidad de ambas serovariedades en sus respectivos huéspedes o variación antigénica del LPS.<sup>45</sup>

Algunos investigadores han planteado la hipótesis de una fase de localización intracelular en leptospiras virulentas, en la cual se podrían mantenerse protegidas de antibióticos y del sistema inmune.<sup>46</sup> En todo caso, la internación de leptospiras virulentas a la célula podría llevarse a cabo por un mecanismo más dependiente de las funciones de los receptores mediadores de endocitosis y menos dependiente de la función de los microtúbulos.<sup>47</sup>

### **Toxicidad.**

Hay indicios de que el componente citotóxico de las leptospiras adheridas a las células está ubicado en una glicoproteína, ya que esta glicoproteína junto con otros antígenos fueron encontrados acumulados en lesiones renales de los animales inoculados experimentalmente. Así mismo, se ha postulado que los ácidos oleico y palmitoleico sintetizados por *Leptospira* actúan intercalándose en la membrana de la célula huésped, afectando su funcionamiento y dando lugar a la muerte de la célula. Por otro lado, al inocular lípidos de la envoltura externa de *Leptospira* directamente en la piel de cricetos produjeron lesiones necróticas.<sup>48,49,50</sup>

Fosfolipasas hemolíticas como la esfingomielinasa C es producida por cepas patógenas, mientras que *L. biflexa* produce fosfolipasa A<sub>1</sub> e isolecitinasa. Las hemolisinas contribuyen a la hemoglobinuria, anemia hemolítica y el daño observado en leptospirosis aguda.<sup>51</sup>

Hemolisinas tales como la esfingomielinasa C han sido previamente purificadas y los genes correspondientes han sido secuenciados. Aunque para algunos investigadores su participación en la patogenia es incierta, únicamente se ha demostrado su presencia en leptospiras patógenas.<sup>52,53</sup> La liberación de linfocinas tales como el factor de necrosis

tumoral alfa (FNT- $\alpha$ ) procedente de monocitos, es originada por la actividad endotóxica del lipopolisacárido (LPS), lo cual puede considerarse como un importante mecanismo de virulencia. Esta inducción de la liberación del FNT- $\alpha$  puede explicar el daño a células endoteliales con la subsecuente hemorragia, trombocitopenia, agregación plaquetaria. Tanto efectos tóxicos como mitogénicos son inducidos por el lípido A del LPS de *Leptospira*, pero en menor grado comparado con los efectos del LPS de *Escherichia coli* y *Salmonella*.<sup>54,55</sup>

### **Autoinmunidad.**

Las reacciones de autoinmunidad no tienen una participación en el desarrollo inicial de las lesiones en un cuadro de leptospirosis aguda en un huésped susceptible. Sin embargo, la autoinmunidad puede ser importante en el progreso de lesiones renales en perros.<sup>56</sup> En humanos y otras especies animales, particularmente los caballos, un síndrome de uveitis autoinmune puede ocurrir posterior a una infección generalizada como resultado de reacción inflamatoria del tracto uveal. Anticuerpos descritos como de la subclase IgG<sub>b</sub> en antiseros de equinos contra leptospirosas (serovariedades *pomona*, *tarassovi*, *icterohaemorrhagiae*, *wolffi* y *hardjo*) comparten epítopes presentes en córnea de caballos, dando una posible explicación para la opacidad corneal y ceguera que puede producir la leptospirosis equina.<sup>57</sup> La autoinmunidad puede ser una causa de trombocitopenia en leptospirosis clínica avanzada en diferentes especies animales.<sup>58</sup>

### **Quimiotaxis hacia la hemoglobina.**

Se ha demostrado, *in vitro*, que leptospirosas virulentas muestran quimiotaxis hacia hemoglobina, la cual es un componente fundamental de los eritrocitos. Estos resultados apoyan la hipótesis de que las leptospirosas virulentas pueden reconocer hemoglobina en la superficie del agua, la cual es el hábitat más común de éstas bacterias, alcanzando los capilares al entrar por heridas en la piel (tal vez por la influencia de un gradiente hacia hemoglobina), invadiendo de esta forma el cuerpo de los animales y el hombre. Por el contrario, ninguna cepa de *Leptospira biflexa* mostró quimiotaxis hacia hemoglobina. Con estos resultados se sugiere una asociación entre quimiotaxis hacia hemoglobina y virulencia en cepas patógenas de *Leptospira*.<sup>59</sup>

### **Presencia de plásmidos.**

Se logró la detección de un plásmido de 370 Kb en diferentes serovariedades virulentas y avirulentas de *L. interrogans* (*australis*, *autumnalis*, *ballum*, *canicola*, *grippotyphosa*, *hardjo*, *hebdomadis*, *icterohaemorrhagiae*, *pomona*, *pyrogenes* y *tarassovi*). Mientras que, en el caso de *L. biflexa* no se encontró ningún plásmido. Mediante la digestión enzimática del ADN de dicho plásmido con *NotI* se observó un patrón de restricción idéntico para todas las serovariedades. Por otro lado, se determinó que sólo algunas de las cepas que poseían el plásmido mostraban quimiotaxis hacia hemoglobina y además eran letales para cobayos, ratificando así, la existencia de una relación entre virulencia y la quimiotaxis hacia hemoglobina. Estos resultados indican que el factor relacionado con virulencia y quimiotaxis hacia hemoglobina puede estar codificado en el ADN cromosomal y no en el plásmido.<sup>60</sup>

### **La transferencia de información genética contribuye a la evolución, la heterogeneidad y a la adquisición de genes de virulencia.**

Mutaciones de punto, rearrreglos genómicos y la transferencia horizontal de genes son los procesos que rigen la evolución microbiana. Mientras que las mutaciones de punto permiten un desarrollo evolutivo lento, la adquisición y escisión de grandes fragmentos genómicos, rápidamente generan nuevas variantes en las cepas que experimentan este tipo de procesos.<sup>61</sup> Bacteriofagos, plásmidos e islas de patogenicidad (IPA) están involucrados en aquellos procesos que promueven una rápida evolución. Las IPA, en ocasiones, contienen genes también encontrados en fagos y plásmidos, de ahí que estos últimos sean considerados como los precursores de las islas de patogenicidad.<sup>62</sup> Las IPA, que comprenden regiones de ADN de hasta 200 kb las cuales contienen más de un gen de virulencia, se han encontrado en bacterias Gram negativas y Gram positivas. Frecuentemente están flanqueadas por secuencias de inserción y se ha visto que se insertan en cercanía a los genes de ARNt, los cuales pueden representar sitios blanco para la integración de estos elementos en el cromosoma bacteriano. El porcentaje de G-C de las IPA normalmente difiere del porcentaje de G-C del cromosoma bacteriano en el que ésta se localiza, lo cual sugiere la posibilidad de transferencia horizontal entre bacterias.<sup>63,64</sup>

Genes de virulencia de bacterias patógenas, los cuales codifican para la síntesis de toxinas, adhesinas, sistemas de secreción y enzimas extracelulares entre otros, pueden estar localizados sobre elementos genéticos transferibles, tales como transposones, plasmidos,



bacteriofagos o IPA.<sup>63</sup> Es por eso que la adquisición de nuevos genes mediante transferencia horizontal ya sea por transformación con ADN desnudo, transducción con fagos, conjugación con plásmidos o la transposición de las IPA da como resultado la generación de nuevas variantes de patógenos.<sup>64</sup>

Los elementos trasposables o transposones son secuencias de ADN que pueden insertarse dentro de sitios no homólogos del genoma bacteriano. Las secuencias de inserción (**SI**) son una clase de elementos trasposables encontrados en bacterias.<sup>65</sup> Típicamente, las **SI** presentan un intervalo de tamaño que va de las 700 a las 2500 pb y contienen uno o más marcos abiertos de lectura (**MAL**). Estos **MAL**, usualmente codifican para la síntesis de proteínas asociadas con la transposición de elementos. Secuencias repetidas inversas de 10 a 40 pb de largo son usualmente encontradas en los extremos de estas **SI**<sup>65</sup>

La mayoría de las secuencias de inserción han sido encontradas en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, gracias al estudio de este tipo de bacterias se conocen muchos de los mecanismos de transposición.<sup>65</sup>

En años recientes se han aislado **SI** a partir de un gran número de bacterias dentro de las cuales se incluyen las espiroquetas.<sup>66,67,68,69,70</sup>

Ante la evidencia de inserciones, deleciones y transposiciones en la organización genética de *L. interrogans*,<sup>71</sup> se ha planteado la hipótesis acerca de que la recombinación entre copias de secuencias repetitivas de ADN, puede ser usada para generar los rearrreglos detectados durante los estudios de construcción de mapas físicos.

Diferentes tipos de secuencias repetitivas que incluyen a las **SI** se han encontrado en el genoma de *Leptospira*<sup>66,67,68,69,70,72</sup> Una secuencia de inserción (**IS1533**) ha sido aislada a partir de *L. borgpetersenii* y caracterizada.<sup>68,70,73</sup> Este elemento pertenece a la reciente familia reconocida **IS110** de elementos trasposables y el análisis del mismo sugiere que **IS1533** puede estar involucrado en rearrreglos cromosomales.<sup>69,70</sup> Los genomas de diferentes serovariedades de *Leptospira* contienen entre 0 y 60 copias de secuencias relacionadas a **IS1533**.<sup>74</sup> Dado que el número de copias difiere en las diferentes serovariedades y entre los aislamientos de un mismo serovar, es probable que la **IS1533** sea un elemento transposable activo.<sup>69,70,74</sup>

Una secuencia de inserción recientemente descrita **IS1500** a partir de la serovariedad *pomona* fue marcada radioactivamente y utilizada en reacciones de hibridación por la técnica de *Southern blot*. Los resultados de las hibridaciones con ésta sonda, demostraron

una variabilidad genética entre aislamientos correspondientes a la serovariedad *pomona*. Lo anterior, ha llevado a pensar a los investigadores, en la posibilidad de diferenciar serovariedades de *L. interrogans* mediante el uso de las secuencias de inserción.<sup>75</sup>

La electroforesis de pulsos en geles de agarosa, al igual que otras técnicas moleculares, ha revelado una considerable heterogeneidad en *L. interrogans*, sugiriendo que la transposición podría ser un fenómeno constante en éste género.<sup>76,77</sup>

### **Genes reportados en el género *Leptospira*.**

En el banco de genes (*GeneBank*), aproximadamente 50 genes del género *Leptospira* han sido reportados, los cuales incluyen tanto a leptospirosas patógenas como saprófitas. Se han descrito genes que codifican para la síntesis de flagelo, proteínas de la membrana externa, proteínas transmembranales, lipoproteínas, proteínas de choque térmico, proteínas enzimáticas que participan en diferentes procesos metabólicos, hemolisinas, subunidades de las enzimas ARN polimerasas, una probable transposasa y ARNt.<sup>Ω</sup>

### **Diagnóstico.**

Uno de los aspectos que hacen a la leptospirosis una enfermedad de interés en la salud pública y en medicina veterinaria, es su difícil diagnóstico. La diversidad de signología y sintomatología hacen necesario el apoyo de métodos diagnósticos de laboratorio, pero no de un laboratorio de análisis clínicos, sino de un laboratorio especializado en el diagnóstico de leptospirosis.

Muchos de los trabajos sobre *Leptospira* y leptospirosis han sido realizados e impulsados no por Médicos o Microbiólogos sino por Médicos Veterinarios Zootecnistas debido a que las consecuencias económicas de la leptospirosis incluyen la pérdida de la productividad animal y por consiguiente de diferentes productos de origen animal destinados al consumo de la población en general. De igual forma, una de las principales tareas que tienen los Médicos Veterinarios es salvaguardar la salud de las especies animales con las que el ser humano tiene contacto, principalmente si se trata de enfermedades que pueden ser transmitidas directa o indirectamente de los animales al hombre como la leptospirosis.

---

<sup>Ω</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

En México, la prueba de Aglutinación Microscópica (AM) es considerada la prueba de referencia para el diagnóstico de la leptospirosis.<sup>19</sup>

Existen diferentes técnicas para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis, sin embargo, el examen serológico mediante la AM, es la prueba indirecta de mayor uso y por sus características se considera como la prueba de referencia en la República Mexicana.

A diferencia de otras técnicas diagnósticas esta prueba ofrece las siguientes ventajas:

- a) Detección de anticuerpos contra diferentes serovariedades de *Leptospira interrogans*.
- b) Determina contra cual de las diferentes serovariedades de *Leptospira interrogans* se ha montado una respuesta inmune.
- c) Da a conocer el título de anticuerpos que alcanzó el suero problema, lo cual ayuda a establecer en conjunto con la historia clínica y el examen físico, la condición del paciente.

El exámen serológico y su uso en la práctica está relacionado con el curso natural de la enfermedad. En la leptospirosis, generalmente se detectan anticuerpos por la prueba de aglutinación microscópica después de la primer semana de haber adquirido la infección y alcanza los títulos máximos alrededor de la tercera o cuarta semana. Posterior a la infección, pueden persistir títulos bajos de aglutininas durante meses e incluso años. Por esta razón, es necesario examinar muestras pareadas siempre que sea posible: una durante la fase aguda de la enfermedad y otra a la segunda o tercera semana post-infección, para detectar un probable aumento en los títulos de anticuerpos, lo cual sería indicativo de una infección activa.<sup>2,12,18</sup>

El fundamento de la prueba se basa en la detección microscópica en campo oscuro de reacciones Ag-Ac mismas que son visualizadas como agregados de leptospiros móviles. Estas reacciones se presentan al enfrentar el suero de un animal o un humano con cultivos vivos puros de *L. interrogans*.<sup>18</sup>

## **Las herramientas moleculares son una alternativa para el diagnóstico de enfermedades como la leptospirosis.**

La identificación y clasificación de bacterias es normalmente realizada mediante morfología, requerimientos nutricionales, resistencia a antibióticos, comparación de isoenzimas, sensibilidad a fagos y serología entre otras.<sup>18,78,79,80,</sup>

El surgimiento de técnicas para la manipulación de ácidos nucleicos ha traído consigo la oportunidad de implementar ensayos para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, que ofrecen un alto grado de especificidad y sensibilidad, en particular para aquellas en las que el aislamiento del agente etiológico representa un reto difícil de superar como en el caso de las leptospiras.<sup>81</sup> Recientemente, métodos basados en el estudio del ADN, particularmente secuencias de ARNr,<sup>82</sup> oligonucleótidos fluorescentes específicos para un microorganismo en particular,<sup>83</sup> la hibridación de ADN<sup>81</sup> y la reacción en cadena de la polimerasa "PCR",<sup>84,85</sup> se han utilizado, para lograr la detección de microorganismos patógenos. Cada uno de estos métodos tiene aplicaciones específicas, así como ventajas y desventajas. Un método complementario que es simple, rápido y que puede ser aplicado a cualquier microorganismo a partir del cual el ADN puede ser preparado se ha denominado PCR iniciado aleatoriamente (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction AP-PCR), el cual requiere únicamente de conocimientos básicos de bioquímica o biología molecular, de las especies que están siendo estudiadas y no se requiere información previa de la secuencia de nucleótidos. De esta forma, huellas genómicas de genomas complejos pueden ser generadas usando iniciadores escogidos arbitrariamente en reacciones de PCR. Este método involucra dos ciclos de baja astringencia en la amplificación seguidos por PCR en condiciones de alta astringencia. De tal forma que, cepas de diversos microorganismos pueden ser distinguidas mediante la comparación del polimorfismo en las huellas genómicas.<sup>86</sup>

Varias técnicas para el aislamiento de ADN cromosomal de leptospiras han sido previamente descritas y sus usos han derivado en análisis taxonómicos diagnósticos mediante el uso de sondas de ADN con un grado de sensibilidad y especificidad mucho mayores que las ofrecidas por otras técnicas diagnósticas.<sup>18,26,87,88,89,90,91,92,93</sup>

## **Terapia con Antibióticos.**

Las leptospiras son sensibles a muchos antibióticos excepto a cloranfenicol y rifampicina. Para que el tratamiento antibiótico sea efectivo deber ser instituido generalmente dentro de

los primeros 7 a 10 días después de la infección, no 7 a 10 días después de que se realizó el diagnóstico, o de que aparecieron los síntomas dado que las leptospiras son removidas de la circulación sanguínea mediante los elementos del sistema inmune después de este tiempo.<sup>2</sup>

El uso de penicilina es una excelente alternativa sobre todo si hay afección renal, ya que este compuesto se elimina activo vía renal, sin llegar a ser nefrotóxico.<sup>94</sup>

En un estudio de susceptibilidad a quimioterapéuticos *in vitro*, realizado con representantes de 21 de los 25 serogrupos de *L. interrogans*, se observó que, contrario a lo que sucede con las serovariedades representantes de 19 serogrupos, las cuales se muestran sensibles a la acción de las penicilinas naturales, representantes de los serogrupos *canicola* e *icterohaemorrhagiae* cultivadas en medios líquidos suplementados con suero de conejo e incubados a 30 °C, se comportaron resistentes a la acción de penicilinas naturales.<sup>95</sup>

Por otro lado, en un estudio realizado con animales de laboratorio se reportó que el uso de penprocilina después de un corto periodo profiláctico falló, al no impedir la infección contra *Leptospira icterohaemorrhagiae*.<sup>96</sup> A pesar de estos hallazgos desfavorables la penicilina continua siendo uno de los antibióticos indicados para el tratamiento de la leptospirosis.

Antibióticos alternativos ante la posibilidad de reacciones alérgicas para penicilina incluyen a la eritromicina en dosis de 250 mg cada 6 horas durante 5 días. La administración de doxiciclina en dosis de 100 mg por vía oral cada 12 horas mostró una reducción en la severidad y duración de la enfermedad.<sup>97</sup>

El antibiótico de elección para el tratamiento de leptospirosis en las diferentes especies de animales domésticos es la dihidroestreptomomicina a dosis de 5 a 25 mg/kg de peso durante 7 a 14 días.<sup>19,98</sup> El uso de tetraciclinas está contraindicado en pacientes con falla renal debido a que es nefrotóxica.

## **HIPOTESIS.**

A partir de un banco genómico de expresión construido con *L. icterohaemorrhagiae* se obtendrán clonas recombinantes conteniendo genes que expresen antígenos relacionados con el proceso de infección.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Clonar y secuenciar genes de *Leptospira interrogans* serovariedad *icterohaemorrhagiae* con la finalidad de profundizar en el conocimiento acerca del metabolismo, componentes antigénicos y virulencia en este tipo de espiroquetas.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS.**

- 1.- Aislamiento de genes que expresen proteínas inmunogénicas de *Leptospira*, a partir de un banco genómico de expresión construido con la serovariedad *icterohaemorrhagiae*.
- 2.- Secuenciación y análisis de los genes clonados.

## MATERIAL Y METODOS.

Se utilizó a la serovariedad *icterohaemorrhagiae* cepa RGA, la cual fue cultivada a 30°C durante cinco días en medio líquido EMJH descrito por Ellinghausen & McCullough<sup>99</sup> y modificado por Johnson & Harris<sup>100</sup>, el cual fue suplementado con 10% de albúmina sérica bovina fracción V.

### **Producción de un Antisuero Policlonal contra *Leptospira interrogans* serovariedad *icterohaemorrhagiae*.**

La producción del antisuero policlonal se realizó de acuerdo al protocolo recomendado por el laboratorio de referencia en *Leptospira* del Instituto Pasteur de Francia.<sup>101</sup>

#### **1.- Animales utilizados.**

Se utilizaron seis conejos adultos pesando de 2.5 a 5 kg. Se obtuvo una muestra de sangre a partir de la vena marginal de la oreja, la muestra fue centrifugada a 3000 rpm (rotor *Jouan 0.050 KG RPM (TR/MN) 17,000*), se obtuvo el suero y se procedió a realizar una dilución 1:25 utilizando solución salina fosfatada (PBS) pH 7.4 [solución salina fosfatada: phosphate buffered saline (PBS)] y se procedió a realizar la prueba de aglutinación microscópica (AM) en campo oscuro utilizando 19 serovariedades de *Leptospira interrogans*. De esta forma se constató que los conejos no presentaban anticuerpos contra *L. interrogans*.

#### **2.- Preparación del inóculo.**

La serovariedad *icterohaemorrhagiae* fue cultivada en medio Stuart enriquecido con 10% de suero de conejo y se mantuvo en incubación a 30°C por un periodo de 5 a 7 días, para obtener aproximadamente  $2 \times 10^8$  leptospiras/ml (la cuenta se realizó con una cámara de Petroff Hausser. Se realizaron pruebas de esterilidad en agar sangre a los cultivos de *L. icterohaemorrhagiae* previamente a la inoculación de los conejos, para verificar su pureza. El inóculo ya listo se inactivó a 56°C durante 30 min antes de la inoculación.

**3.- Inoculación de animales.** Los conejos se inocularon vía intravenosa a través de la vena marginal de la oreja sucesivamente cada 7 días con el siguiente esquema:

Primera semana. 1 ml del inóculo.

Segunda semana. 2 ml del inóculo.  
Tercera semana. 4 ml del inóculo.  
Cuarta semana. 6 ml del inóculo.  
Quinta semana. 6 ml del inóculo.

#### **4.-Determinación de la especificidad del antisuero policlonal producido.**

Se recolectó una muestra de sangre de cada conejo, 2 semanas después de la última inoculación, se obtuvo el suero y se realizó la prueba de AM siguiendo el método descrito por Myers, 1985.<sup>18</sup> Para demostrar la especificidad del antisuero producido hacia la serovariedad *icterohaemorrhagiae* se enfrentó a 19 serovariedades de *L. interrogans*.

#### **5.- Titulación del antisuero policlonal.**

Para conocer el título que alcanzó el antisuero se realizaron diluciones dobles seriadas del antisuero (dilución 1:50 hasta la dilución 1:51,200) y se realizó la técnica de AM utilizando únicamente a la serovariedad *icterohaemorrhagiae*. Posterior a la lectura de la prueba, se determinó que el título del antisuero era adecuado, por lo que los conejos fueron anestesiados y posteriormente desangrados para la obtención del suero, el cual finalmente fue una mezcla de los seis conejos.

#### **6.- Almacenamiento del antisuero policlonal.**

El antisuero producido se filtró utilizando membranas estériles de 0.45  $\mu$  y se almacenó en volúmenes de 1 ml a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **Adsorción del antisuero policlonal.**

La adsorción del antisuero se realizó siguiendo el protocolo descrito por Graber *et al.*, 1985.<sup>102</sup>

1. Se cultivaron por separado dos matraces con 500 ml de caldo Luria Bertani (LB) con la cepa *Escherichia coli* XL1 azul cultivada previamente en agar LB y se incubaron durante 16 h a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación orbital a 200 rpm.
2. Se esterilizaron 500 ml de cultivo a  $121^{\circ}\text{C}$  a 15 libras de presión por 15 min y los otros 500 ml de cultivo se inactivaron con formalina a una concentración final de 0.5% por 2 h a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación orbital a 200 rpm.



3. Ambos cultivos fueron mezclados y centrifugados a 5000 rpm (rotor *Jouan 0.600 KG RPM tr/mn 11,500 MAXI*) a 4°C por 10 min y lavados 2 veces con PBS pH 7.4 centrifugando en cada lavado a 5000 rpm (rotor *Jouan 0.600 KG RPM tr/mn 11,500 MAXI*) a 4°C 10 min.
4. El sedimento fue resuspendidas en 2 ml de PBS por cada 50 ml de cultivo procesado y almacenadas en volúmenes de 1 ml a -70°C.
5. El antisuero policlonal contra *L. icterohaemorrhagiae* con un título de 1:25,600 fue diluido 1:50 en PBS con 1% de albúmina en un volumen final de 15 ml. De igual forma, se diluyó un suero de conejo negativo a *L. interrogans* (1:50) y se procesó conjuntamente con el suero positivo para su posterior uso como **control negativo** durante los escrutinios en el banco genómico.
6. Se mezcló 1 ml de bacterias con ambos sueros diluidos y la mezcla se dejó incubando durante 16 h con agitación orbital a 200 rpm a 4°C.
7. La mezcla se centrifugó 5000 rpm (rotor *Jouan 0.600 KG RPM tr/mn 11,500 MAXI*) a 4°C, 10 min, se recuperó el sobrenadante en otro tubo, se añadió 1 ml de bacterias y se incubó 2 h a 4°C con agitación orbital. Este proceso se repitió hasta completar 4 procesos de adsorción.
8. Finalmente, el antisuero se filtró a través de membranas estériles *millipore* de 0.22 µm y se almacenó en volúmenes de 0.5 ml a -70°C hasta su uso.

### **Extracción de ADN Cromosomal.**

La extracción de ADN cromosomal de *L. interrogans* serovariedad *icterohaemorrhagiae* se realizó siguiendo el método de lisis alcalina,<sup>88</sup> el cual se detalla a continuación:

1. **Preparación de las bacterias.** Se realizó la concentración de un cultivo de *L. icterohaemorrhagiae* en fase exponencial (crecimiento de 5 días a 30°C) mediante

centrifugación a 31,000 x g (rotor *Beckman JA-17 17,000 RPM MAX. SER.586*) durante 20 min a 4°C y el sedimento obtenido se reconstituyó en una solución Tris 10 mM - EDTA 1 mM pH 8.0 (solución amortiguadora TE) para luego ser transferido a un tubo de microcentrifugación y ser centrifugado nuevamente durante 10 min a 13,000 x g (rotor *Savant model RSR-20, 13,000 x g*) a 4°C.

- 2. Lisis alcalina de las bacterias para liberar el ADN.** El sobrenadante se eliminó y el sedimento fue reconstituido en 500 µl de una solución Glucosa 50mM - EDTA 10mM - Tris 2.5 mM pH 8.0 conteniendo 10 mg/ml de lisozima. Se incubó 30 minutos a 37°C y posteriormente se procedió a la lisis alcalina con 40 µl de dodecil sulfato de sodio (SDS al 10%), incubando nuevamente 20 min a 37°C. Posterior a la incubación, se adicionaron 20 µl de una solución fría de acetato de potasio (3 M potasio - 5 M acetato) colocando el tubo en hielo por 5 a 10 min. La mezcla fue entonces centrifugada a 13,000 x g (rotor *Savant model RSR-20, 13,000 x g*) por 10 min a 4 °C y el sobrenadante conteniendo ADN cromosomal fue transferido a otro tubo.
- 3. Extracción de ADN mediante el uso de fenol.** La extracción de ADN cromosomal se realizó con una solución 50% fenol equilibrado pH 8.0 y 50% cloroformo - alcohol isoamílico (24 partes de cloroformo por 1 de alcohol), invirtiendo el tubo 20 veces. Posteriormente, se centrifugó a 13,000 x g (rotor *Savant model RSR-20, 13,000 x g*) por 10 min y cuidadosamente se separó la fase acuosa evitando el precipitado proteico. Se adicionaron 60 µl de una solución fría de acetato de sodio 3M y 750 µl de isopropanol y esta solución se conservó a -20°C durante 3 h.
- 4. Obtención final del ADN.** El ADN precipitado, se colectó por centrifugación a 13,000 x g (rotor *Savant model RSR-20, 13,000 x g*) por 10 min y el sedimento lavado con etanol al 70% y secado al aire durante 10 min. El sedimento conteniendo ADN cromosomal finalmente se resuspendió en 50 µl de solución amortiguadora TE y 100 µg/ml de RNAasa libre de DNAasa.

5. **Visualización del ADN extraído.** La presencia de ADN cromosomal en las muestras sometidas al proceso de extracción se determinó mediante la separación por electroforesis en geles de agarosa al 0.7%, los cuales fueron teñidos con bromuro de etidio (5 µg/ml) y posteriormente visualizados con luz ultravioleta.<sup>103</sup>
6. **Cuantificación de ADN.** La concentración de ADN (ng/µl), se determinó por fluorometría a una densidad óptica a 260 nm<sup>ψ</sup>.

### **Construcción del Banco Genómico de Expresión.**

El ADN de *L. icterohaemorrhagiae* se sometió a una digestión parcial con la enzima de restricción *EcoRI* a una concentración de 0.14 U/µg de ADN durante 30 min a 37°C para generar fragmentos con un tamaño de 2 a 6 kb (FIGURA 1), los cuales fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TBE (Tris-borato 45 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0). Los fragmentos con los extremos *EcoRI* fueron purificados utilizando perlas de sílica<sup>•</sup> (FIGURA 2).

Los fragmentos de ADN fueron ligados a los brazos del fago λ ZAP Express<sup>▲</sup> en una proporción de 10:1 de inserto:vector (FIGURA 3). La ligazón de los insertos se realizó usando 2 Unidades de la enzima T4 ADN ligasa (16 horas a 14 °C). La inserción de ADN recombinante en la región del gen *lac z* de la β-galactosidasa permitirá la selección blanco/azul en cajas de agar Luria Bertani (LB) con X gal por la inactivación del gen *lac Z* dentro del fago λ ZAP Express (FIGURAS 4 Y 5).

Los fagos recombinantes fueron empacados *in vitro*<sup>■</sup> para así incrementar la eficacia de la genoteca, ya que un fago empacado es más difícil que se pierda o se contamine (FIGURA 6).

### **Titulación del Banco Genómico de Expresión.**

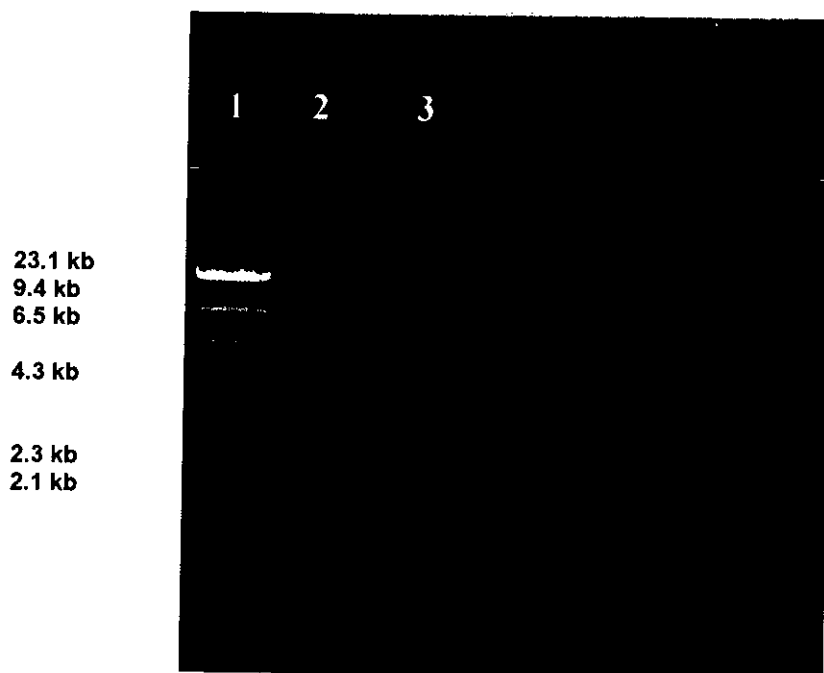
El banco genómico de expresión fue titulado en unidades formadoras de placa (UFP) en el medio LB, determinando así la representación porcentual alcanzada del genoma de *Leptospira icterohaemorrhagiae* que se alcanzó (FIGURA 7).

<sup>ψ</sup> Hoefer DyNA Quant 200 Fluorometer.

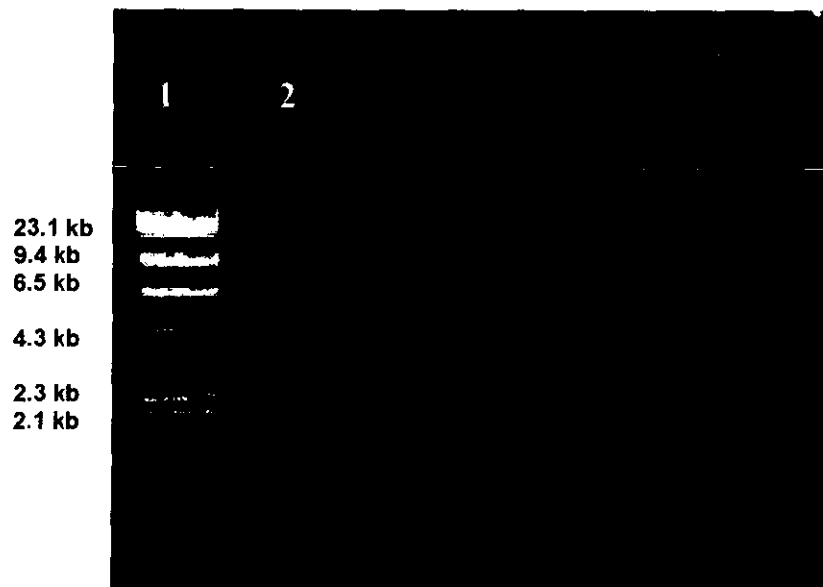
• Sistema comercial GeneClean III BIO 101, INC.

▲ Sistema de clonación λ ZAP Express (*Stratagene*).

■ Sistema Gigapack Gold III (*Stratagene*).



**FIGURA 1.** Digestión a gran escala del ADN de *Leptospira interrogans* serovariedad *icterohaemorrhagiae*. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular  $\lambda$  *HindIII*; los carriles 2 y 3 corresponden a la digestión del ADN con la enzima *EcoRI* (0.14 U/ $\mu$ g)



**FIGURA 2. Purificación de los fragmentos seleccionados. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular  $\lambda$  *Hind*III. El carril 2 corresponde a los fragmentos con un tamaño de 2 a 6 kb del ADN de *Leptospira interrogans* serovariedad *icterohaemorrhagiae*.**



**FIGURA 3. Ligazón de los fragmentos generados a los brazos del vector. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular  $\lambda$  *HindIII*; en el carril 2 se colocó el control negativo (ADN sin vector); en el carril 3 se colocó el fago  $\lambda$  ZAP EXPRESS ligado a los fragmentos seleccionados de *L. interrogans* serovariedad *icterohaemorrhagiae*. En el carril 4 se colocó el control positivo (fago  $\lambda$  ZAP EXPRESS con ADN ligado).**

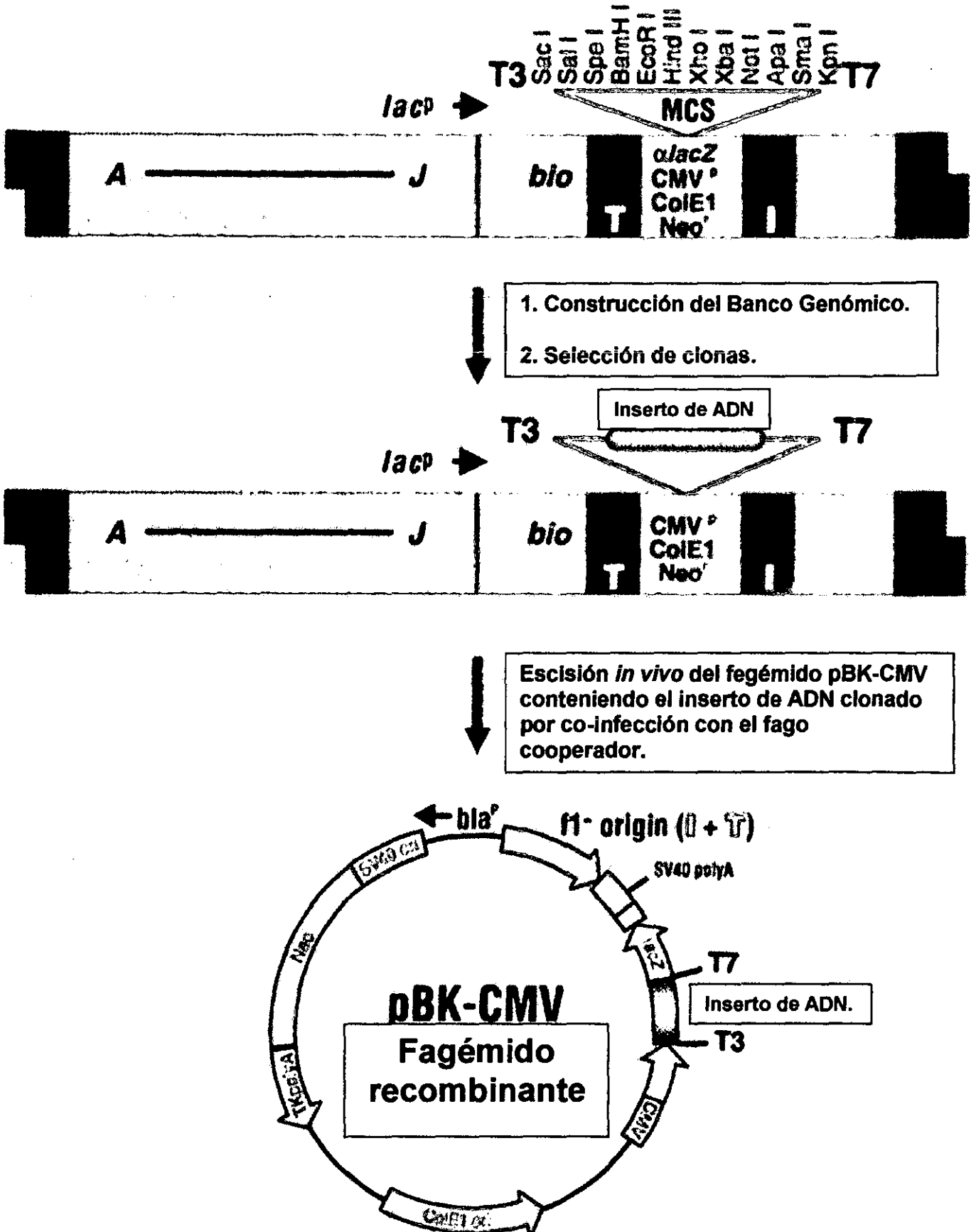
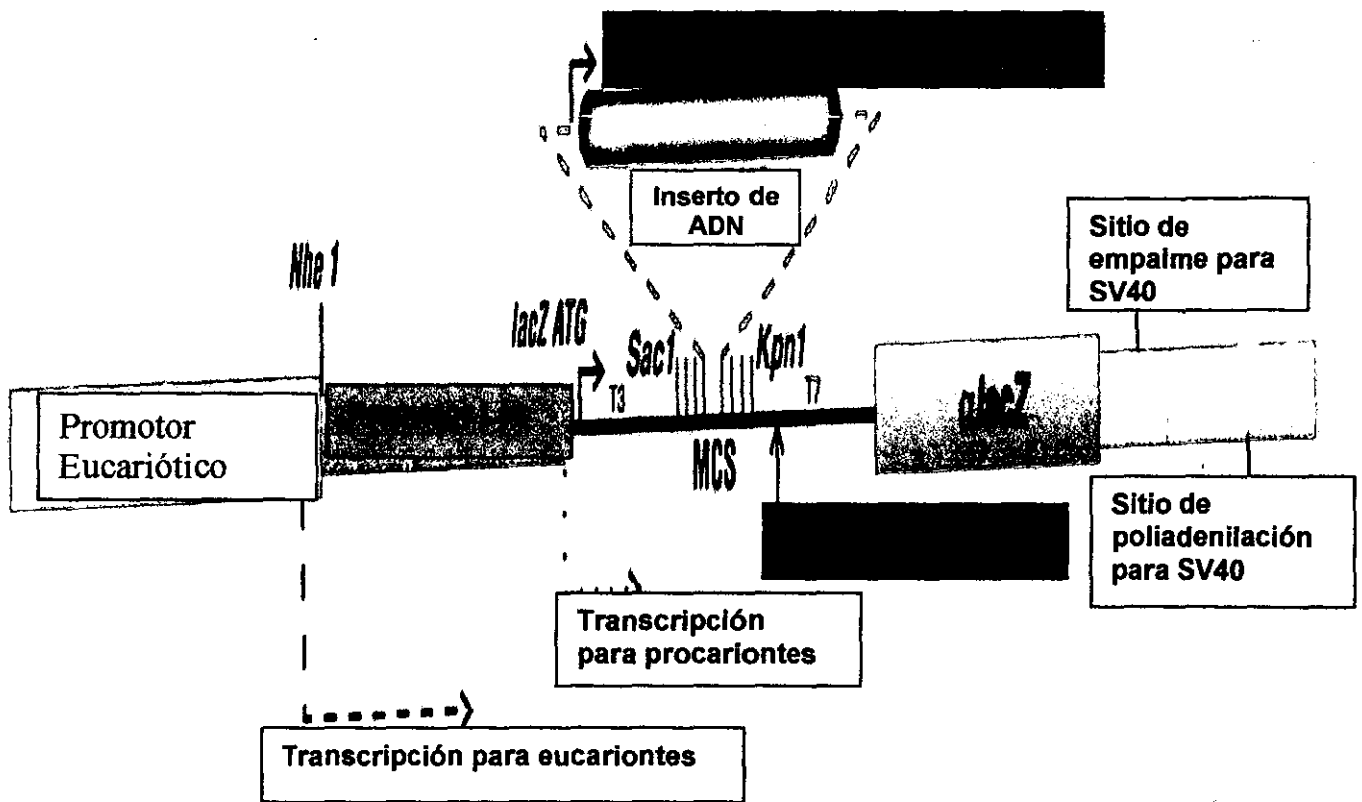


FIGURA 4. MAPA DEL VECTOR DE CLONACION  $\lambda$  ZAP EXPRESS, CON EL CUAL FUE CONSTRUIDO EL BANCO GENÓMICO A PARTIR DE *L. interrogans* SEROVARIEDAD *icterohaemorrhagiae*.



**FIGURA 5.** Al insertarse el ADN de *Leptospira* contiguo al gen *lacZ* del vector de clonación  $\lambda$  ZAP EXPRESS se logra la expresión de la proteína fusionada a la  $\beta$ -D-galactosidasa mediante la inducción con IPTG.



Digestión parcial del ADN de *Leptospira icterohaemorrhagiae*

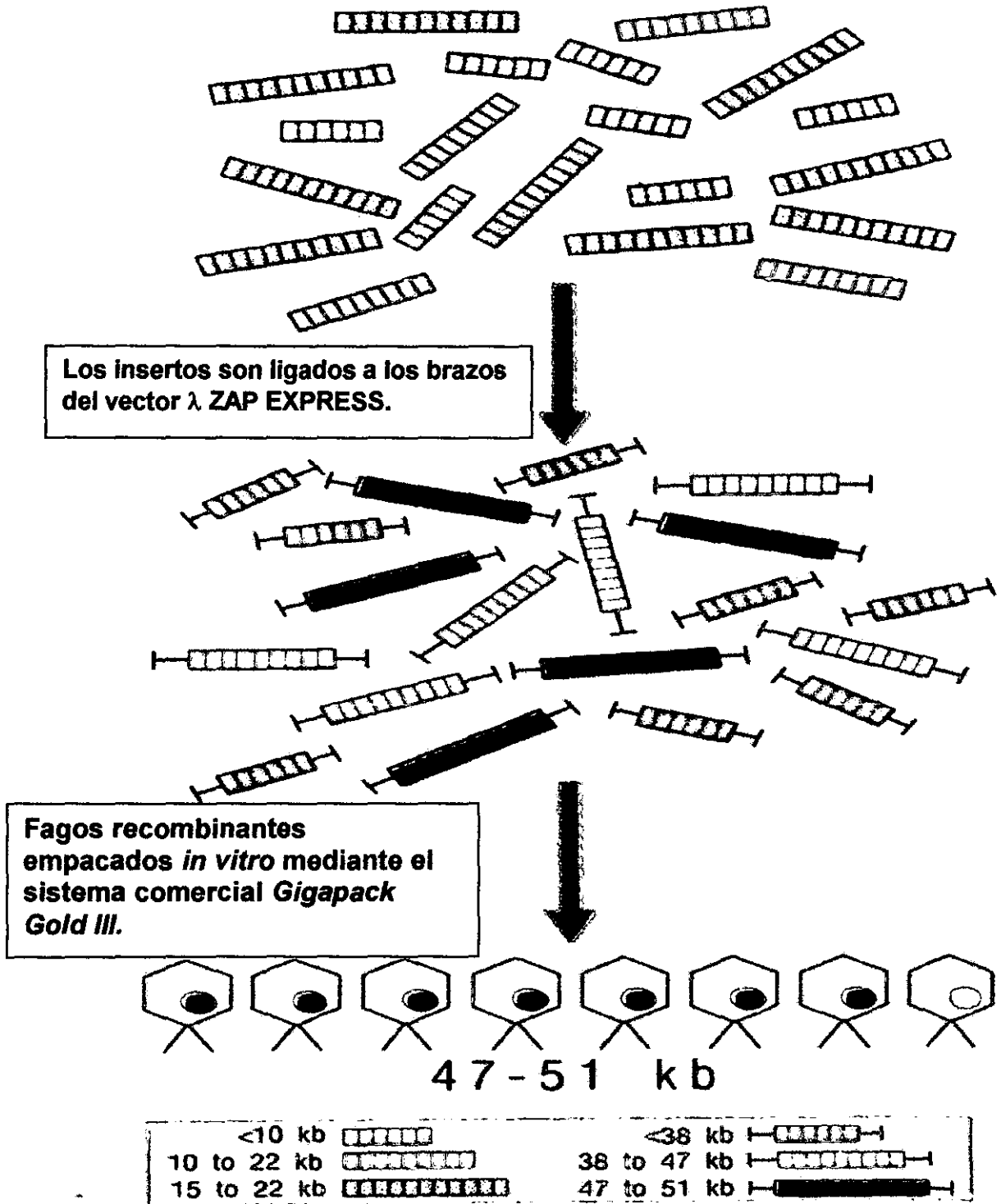
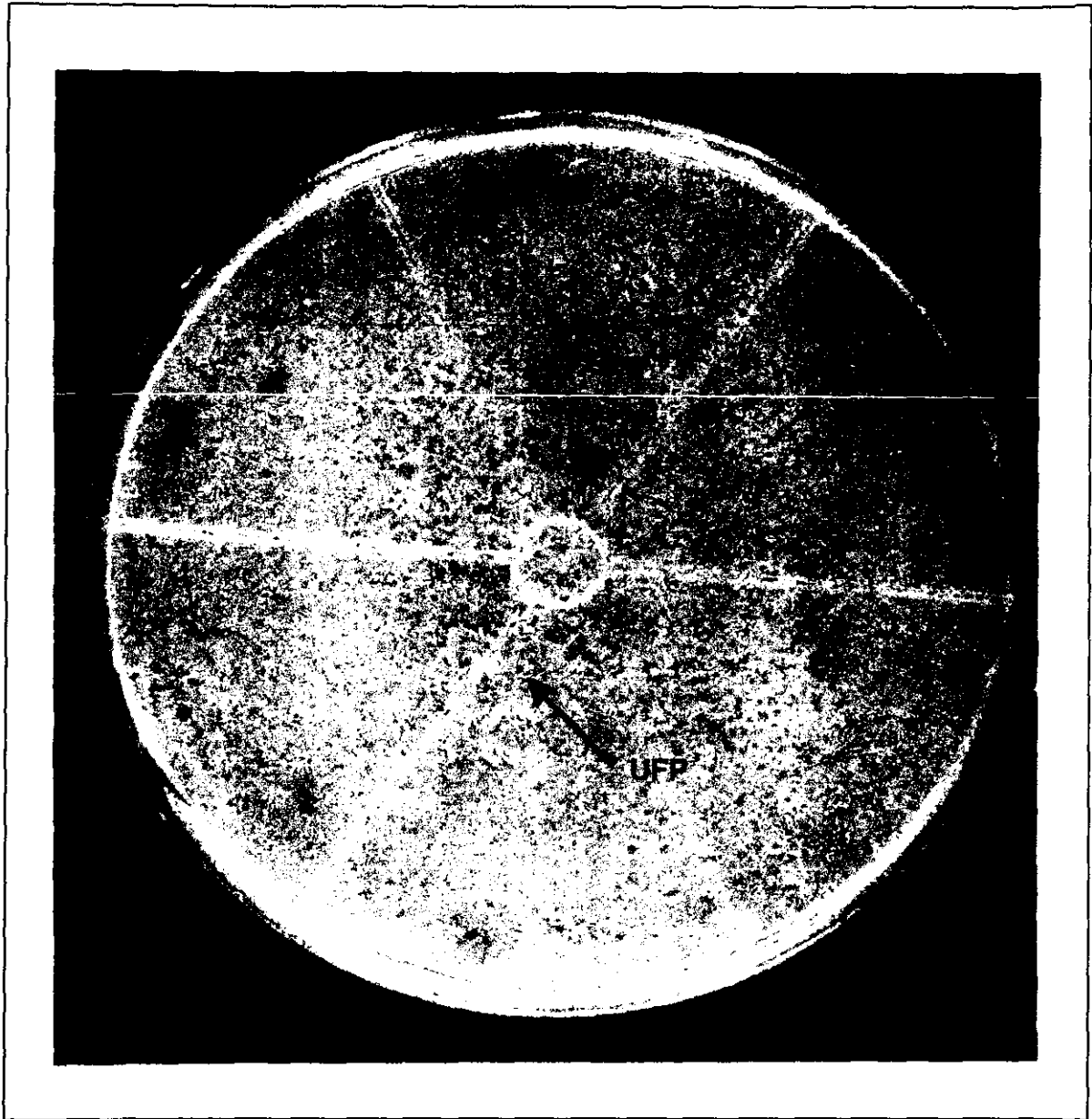


FIGURA 6. Empacamiento *in vitro* de fagos recombinantes.



**FIGURA 7.** Caja de petri conteniendo el banco genómico de expresión, el cual fue titulado en unidades formadoras de placa (UFP). El cálculo de la probabilidad de representación de todos los genes de *Leptospira interrogans* serovariedad *icterohaemorrhagiae* en el banco, se realizó con la siguiente formula:  $P = 1 - (1 - f)^N$

Para calcular la probabilidad de que todos los genes de la serovariedad *icterohaemorrhagiae* estuvieran representados en la biblioteca, se utilizó la siguiente fórmula:

$$P = 1 - (1 - f)^N$$

Donde:

P = Probabilidad.

f = Fracción del genoma en una recombinante.

N = Número de clones recombinantes.

### **Selección de Clones Recombinantes.**

La selección de clonas recombinantes se realizó con un suero policlonal específico para *L. icterohaemorrhagiae* adsorbido con *E. coli* XL1 azul mediante electro inmuno electroforesis en colonia (*Colony blot*), para ello el banco genómico fue sembrado a un título de 40,000 UFP en agar LB con sobre agar NZY, sin X-gal e isopropil-β-D-tiogalactosido (IPTG).

**1. Preparación de bacterias competentes.** Cultivos de 24 horas de *Escherichia coli* XL1 azul crecidas a 37°C en cajas de agar LB, fueron inoculados en caldo LB y mantenidos en agitación orbital a 200 rpm a 30°C durante 16 h (0.5 OD 600). Posteriormente las bacterias fueron centrifugadas a 5000 rpm (rotor *Jouan* 0.600 KG RPM tr/mn 11,500 MAXI) a 4°C durante 15 min, el sobrenadante se eliminó y la pastilla de bacterias fue reconstituida en 10 mM Mg SO<sub>4</sub> y mantenida en refrigeración hasta su uso.

**2. Infección de bacterias con el fago recombinante.** El fago λ ZAP Express recombinante fue adsorbido en *E. coli* XL1 azul, mediante incubación a 37°C por 20 min. La bacteria infectada con el fago λ se mezcló con sobre-agar a 50°C y colocó en placas de agar LB, las cuales se incubaron a 42°C por 4 a 6 h hasta observar UFP de 1 a 2 mm de diámetro.

**3. Inducción de la síntesis de la proteína fusionada a β-galactosidasa con IPTG.** Previamente, se impregnaron membranas de nitrocelulosa con IPTG 10 mM y se colocaron dentro de las cajas para inducir la transcripción del gene de la β-galactosidasa y en

---

consecuencia, la expresión de proteínas de *Leptospira* fusionadas a la  $\beta$ -galactosidasa, las cuales se unen a la membrana de nitrocelulosa (incubación a 37°C, 16 h). Posterior a la incubación, las membranas de nitrocelulosa fueron identificadas para conocer la orientación de las áreas de reacción antígeno-anticuerpo.

#### **4. Incubación de las membranas con el anticuerpo primario.**

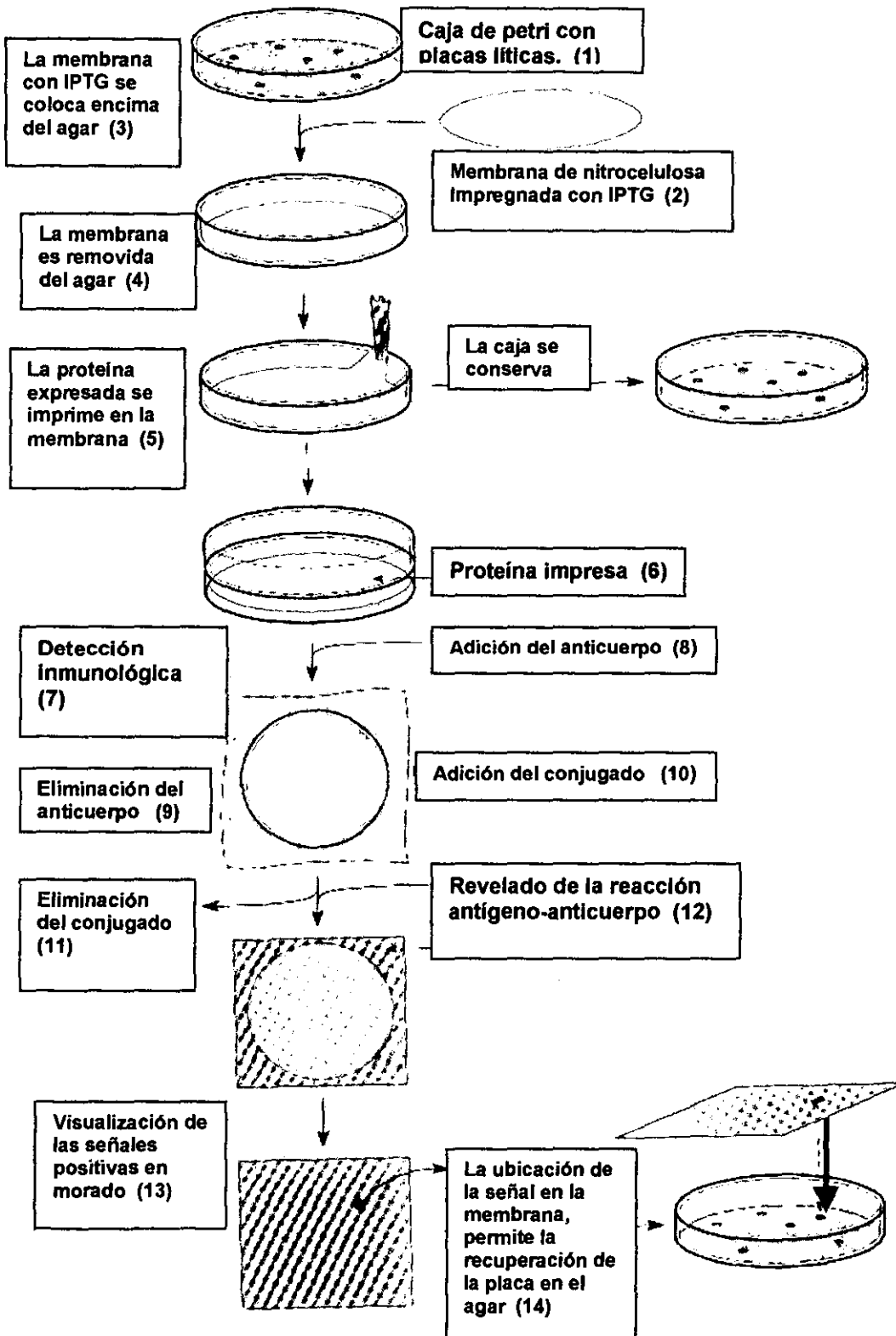
Las membranas fueron removidas suavemente de las cajas de agar que contenían a las placas líticas, se les agregó 1  $\mu$ l de lisado de *L. icterohaemorrhagiae* (control positivo para la inmunotransferencia) y se sometieron a tres lavados de 5 min cada uno, con una solución de Tris HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0.05% (TBS-T) y fluoruro de fenil metil sulfonilo 1mM (PMSF). Los sitios activos (sin antígeno) de la membrana fueron bloqueados con una solución de leche descremada al 5% en TBS-T y PMSF 1 mM durante 1 h. Las membranas fueron nuevamente lavadas con TBS-T tres veces, 5 min cada lavado y se dejaron incubando 16 h a temperatura ambiente (TA) con el anticuerpo primario (suero policlonal de conejo específico para *L. icterohaemorrhagiae* a una dilución 1:100 utilizando TBS-T).

#### **5. Incubación de las membranas con el anticuerpo secundario.**

Posterior a la incubación, las membranas fueron nuevamente lavadas 3 veces, 5 min cada lavado con TBS-T y PMSF 1mM y se incubaron con el anticuerpo secundario (proteína G recombinante conjugada a peroxidasa) a una dilución 1:500 por 2 horas a TA. Finalmente las membranas se lavaron 3 veces 5 min c/lavado con TBS-T y un lavado de 5 min con una solución Tris HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM (TBS).

#### **6. Revelado de las reacciones antígeno-anticuerpo.**

Las membranas fueron colocadas en una solución de revelado (60 mg de 4-cloro-1-naftol, 20 ml de metanol frío, 100 ml de TBS). Finalmente, se agregaron 100  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno al 0.01% y se mantuvieron en agitación a TA, hasta observar las señales positivas de color morado (10 min). Las clonas recombinantes con una señal positiva de la inmunotransferencia fueron colectadas a partir de las placas de agar y almacenadas a 4°C en tubos estériles conteniendo 500  $\mu$ l de solución amortiguadora SM (NaCl 5 g, MgSO<sub>4</sub> 2 g, Tris HCl 1 M pH 7.5, gelatina al 2% 5 ml cbp 1 litro) y 20  $\mu$ l de cloroformo (FIGURA 8).



**FIGURA 8. Procedimiento para la selección de clones recombinantes.**

Así mismo, se incubó una membrana con suero de conejo negativo a *L. interrogans* diluido 1:100 en TBS-T para confirmar la no existencia de reacciones inespecíficas.

### **Escisión *in vivo* del fagémido pBK-CMV.**

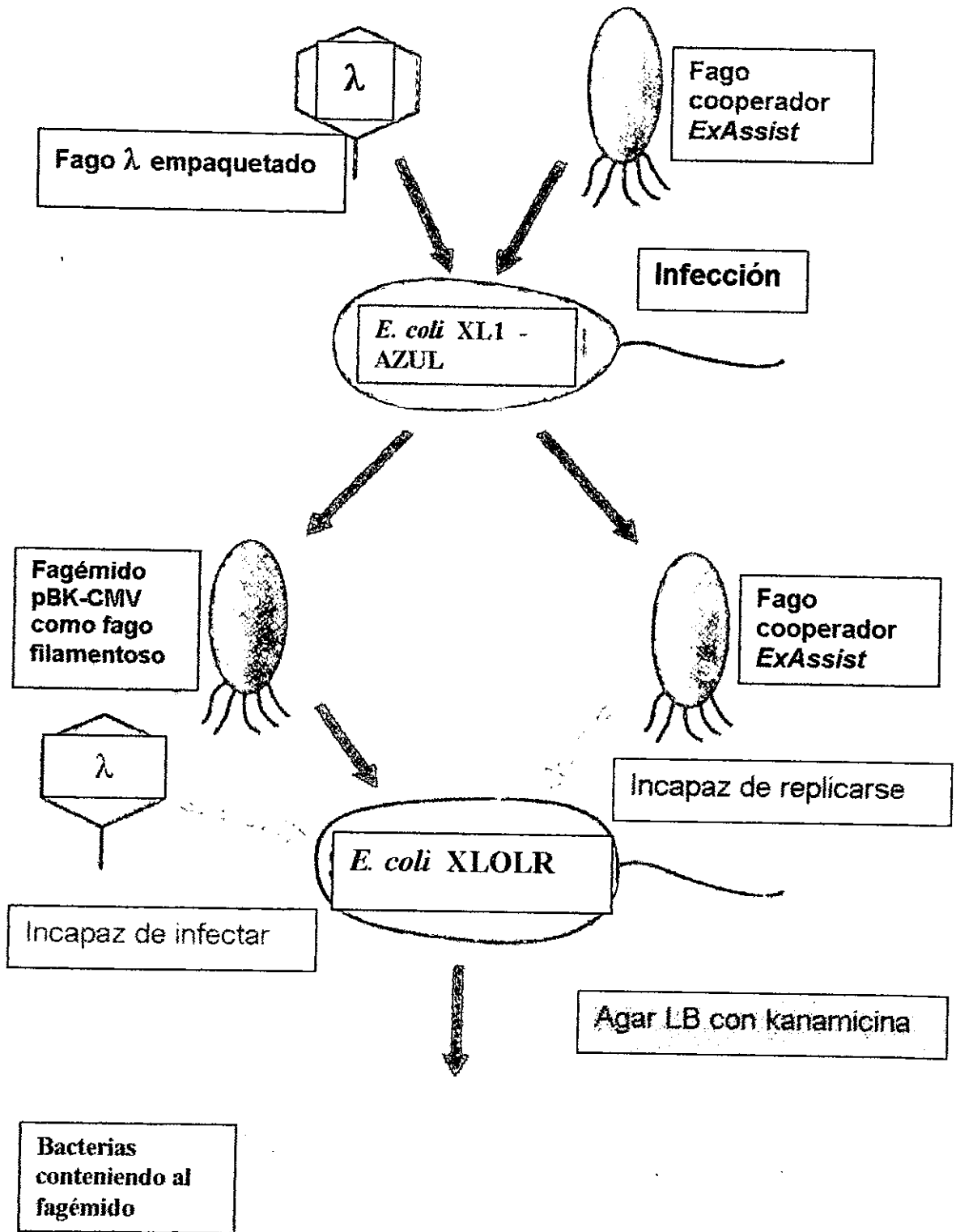
El vector de expresión  $\lambda$  ZAP Express contiene el fagémido pBK-CMV el cual fue escindido *in vivo* mediante co-infección de *E. coli* XL1 azul con  $\lambda$  ZAP Express recombinante seleccionado y bacteriófago cooperador<sup>■</sup>. La presencia del episoma F' en las células XL1 azules es esencial para la expresión del pili sexual, lo que permitió la infección de la bacteria con el bacteriófago cooperador requerido para la escisión *in vivo* del fagémido pBK-CMV (FIGURA 9). Dicho fagémido contiene el ADN insertado, lo que permitió la caracterización del banco genómico de expresión en cuanto al tamaño de los insertos (f) después de ser liberados con la enzima *EcoRI*, así como la orientación de los insertos

Se cultivaron por separado dos cepas diferentes de *Escherichia coli*, la cepa XL1 azul en caldo LB suplementado con 2% de maltosa y  $MgSO_4$  10 mM y la cepa XL0LR en caldo NZY sin suplementos durante 16 h a 30°C. Ambos cultivos fueron centrifugados por separado a 1000 x g (rotor *Beckman JA-17 17,000 rpm max. Ser586*). Se eliminó el sobrenadante y la pastilla bacteriana se resuspendió en un volumen de 10 ml de una solución de  $MgSO_4$  10 mM. En un tubo estéril se colocaron 200  $\mu$ l de *E. coli* XL1 azul, 250  $\mu$ l del fago recombinante a un título  $> 1 \times 10^5$  ufp/ $\mu$ l y 1  $\mu$ l del fago cooperador a un título  $> 1 \times 10^6$  ufp/ $\mu$ l incubándose a 37°C por 15 min. Se adicionaron 3 ml de caldo NZY y la mezcla se incubó 3 h a 37°C en agitación orbital. Posterior a la incubación, la mezcla se colocó a 70°C durante 20 min y finalmente se centrifugó a 1000 x g (rotor *Beckman JA-17 17,000 rpm max. Ser586*) por 15 min y el sobrenadante fue recuperado en un tubo estéril. El sobrenadante contenía al fagémido PBK-CMV liberado (en este momento como **fago filamentoso**).

La recuperación final del fagémido se llevó a cabo mediante la adición de 200  $\mu$ l del cultivo de *E. coli* XL0LR a dos tubos estériles. A un tubo se le añadieron 100  $\mu$ l del sobrenadante conteniendo al fagémido (fago filamentoso) y al otro se le añadieron únicamente 10  $\mu$ l, la mezcla se incubó a 37°C durante 15 min. Una vez concluida la incubación, se adicionaron 300  $\mu$ l de caldo NZY y los tubos se mantuvieron a 37°C por 45 minutos más. Posteriormente, 200  $\mu$ l de la mezcla fueron sembrados en agar LB-Kanamicina (50  $\mu$ g/ml), se incubaron 24 h

---

■ ExAssist™ interference-Resistance Helper Phage (*Stratagene*)



**FIGURA 9. Escisión *in vivo* del fagémido pBK-CMV.**

a 37°C. Las colonias que aparecieron en el agar contenían al fagémido pBK-CMV (recircularizado) con el fragmento clonado.

### **Extracción de ADN de los Fagémidos Recombinantes.**

La extracción de ADN de los fagémidos se realizó por el método de lisis alcalina utilizando un sistema comercial para purificación de ADN de plásmidos<sup>º</sup>.

- 1. Cultivo de bacterias.** *Escherichia coli* XL0LR conteniendo los fagémidos recombinantes fue sembrada en 5 ml de caldo LB-Kanamicina (50 µg/ml) e incubada 24 h a 37°C. El cultivo se centrifugó a 5000 x g (rotor *Jouan 0.600 KG RPM tr/mn 11,500 MAXI*) por 10 min a TA, se eliminó el sobrenadante y la pastilla de bacterias se dejó secando de 10 a 15 min.
- 2. Resuspensión de bacterias.** La pastilla se resuspendió con 210 µl de la solución de suspensión (50 mM Tri-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA), conteniendo RNAasa A (20 mg/ml) hasta homogeneizar por completo.
- 3. Lisis alcalina.** Posteriormente se añadió la solución de lisis (200 mM NaOH, 1% SDS p/v) y se mezcló suavemente invirtiendo el tubo 5 veces y se mantuvo a TA por 5 min.
- 4. Neutralización de la mezcla.** A continuación se añadieron 280 µl de la solución de neutralización (hidrocloruro de guanidina y acetato), se mezcló inmediatamente invirtiendo el tubo 5 veces y se procedió a centrifugar a 12,000 x g (rotor *Savant model RSR-20 13,000 x g*) durante 10 min.
- 5. Unión del ADN a partículas de sílica.** Dentro de un tubo de 2 ml se colocó un cartucho con un fondo a base de membranas de sílica y dentro de éste, se añadió el sobrenadante obtenido en el paso anterior, se centrifugó a 12,000 x g (rotor *Savant model RSR-20 13,000 x g*) durante 1 min.

---

<sup>º</sup> Cocert Maxiprep spin system, Gibco BRL.



6. **Lavado para eliminar restos bacterianos.** El cartucho se colocó dentro de un tubo nuevo de 2 ml, se adicionaron 700  $\mu$ l de la solución de lavado (NaCl 10 mM, EDTA 1 mM y Tris HCl 10 mM, pH 8.0) conteniendo etanol, se centrifugó a 12,000 x g (rotor *Savant model RSR-20* 13,000 x g) durante 1 min.
7. **Liberación del ADN de las partículas de sílica.** Por último el cartucho se colocó dentro de un tubo de 1.5 ml y se adicionaron directamente en el centro de la membrana del cartucho 75  $\mu$ l de TE calentado a 50°C, se dejó incubando a TA por 1 min y se centrifugó a 12,000 x g (rotor *Savant model RSR-20* 13,000 x g) durante 2 min.
8. **Recuperación del ADN del fagémido.** Se retiró el cartucho y en el tubo quedó el ADN del fagémido recombinante ya purificado. El ADN de los fagémidos fue almacenado a 4 °C.

### **Análisis de Restricción.**

El ADN de los fagémidos fue sometido a un análisis de restricción con las enzimas *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Pst*I, *Sal*I, *Scal*, *Xba*I y *Xho*I<sup>×</sup> para determinar el total de clonas únicas

### **Purificación del ADN Clonado de *Leptospira interrogans* serovariedad. *icterohaemorrhagiae*.**

El ADN de las clonas seleccionadas fue digerido con la enzima *Eco*RI (10 unidades) mediante incubación a 37°C por una hora para la recuperación del inserto de ADN de *L. icterohaemorrhagiae*. La purificación del inserto se realizó mediante el uso de perlas de sílica utilizando el siguiente protocolo:

**1.- Obtención de la banda de interés a partir del gel de agarosa:** Se cortó la banda correspondiente al fragmento clonado directamente del gel de agarosa y se pesó para calcular el volumen de solución de yoduro de sodio (NaI) la cual equivale a 3 o 4 veces el peso del gel, considerando para tal efecto que 1 g es igual a 1ml.

---

<sup>×</sup> *Gibco BRL*

**2.- Liberación del ADN contenido en el gel de agarosa:** La mezcla de solución de NaI y agarosa se incubó a 65 °C por 5 min para lograr que la agarosa adquiriera un estado líquido.

**3.- Unión del ADN a las perlas de sílica:** Una vez que la mezcla adquirió el estado líquido en su totalidad, se adicionaron 5 µl de la suspensión EZ-GLASSMILK (perlas de sílica), se homogeneizó la mezcla nuevamente y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 5 min.

Posterior a la incubación, la mezcla fue centrifugada durante 10 segundos a 12,000 rpm (rotor *Savant model RSR-20 13,000 x g*), el sobrenadante fue eliminado y el ADN unido a las perlas quedó en el fondo del tubo.

**4.- Lavados para eliminar agarosa y sales:** A continuación se realizaron tres lavados con 500 µl de la solución de lavado (NaCl, EDTA y Tris HCl pH 8.0). En cada paso se homogeneizó la mezcla, se centrifugó a 12,000 rpm (rotor *Savant model RSR-20 13,000 x g*) durante 10 seg y el sobrenadante fue eliminado.

**5.- Liberación del ADN de las perlas de sílica y recuperación del mismo:** Finalmente, se añadieron 13 µl de la solución amortiguadora de elución (agua deionizada estéril con 100 µg/ml de RNAasa libre de DNAasa), se mezcló perfectamente con las perlas de sílica y se centrifugó a 12,000 rpm (rotor *Savant model RSR-20 13,000 x g*) durante 30 segundos. El ADN del fragmento clonado resuspendido en la solución amortiguadora de elución fue recolectado directamente del tubo mediante el uso de una micropipeta y trasladado a un tubo nuevo. Se repitió nuevamente esta operación para recuperar la mayor cantidad posible del ADN.

**6.- Cuantificación del ADN obtenido:** Se cuantificó por fluorimetría a 260 nm de longitud de onda. Las cantidades de ADN de los fragmentos clonados, ya purificados fluctuaron entre 75 a 130 ng/µl. El ADN de los fragmentos clonados, ya purificado, se almacenó a 4 °C.

### **Secuenciación de Nucleótidos.**

La secuencia del gene se realizó en un secuenciador automático, en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, localizado en la unidad de secuencia, bajo la responsabilidad del M. en C. René Hernández .

### **Análisis de la Secuencia.**

El análisis de la secuencia de ADN fue realizado con el programa MacVector (Macintosh) y la búsqueda de homólogas fué realizada utilizando el sistema BLASTX 2. 0. 3.<sup>104</sup> del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

## RESULTADOS.

### **Extracción de ADN Cromosomal.**

La extracción de DNA cromosomal de *Leptospira interrogans* serovariedad *icterohaemorrhagiae* se logró satisfactoriamente. El DNA cromosomal se observó mediante el examen de los geles con luz ultravioleta (FIGURA 10). La cantidad de ADN cromosomal extraído fluctuó entre 0.7 y 14 ng/ $\mu$ l, que en un volumen de 300  $\mu$ l corresponde a cantidades que van de los 210 a 420 ng totales.

### **Titulación del Banco Genómico de Expresión.**

El banco genómico de expresión se tituló en  $1.22 \times 10^7$  unidades formadoras de placa (UFP) por ml. Considerando que el tamaño del genoma de *L. icterohaemorrhagiae* es de 4,610 kb, que el tamaño promedio de los insertos utilizados que fue de 2 a 6 kb y utilizando el método descrito previamente <sup>105</sup>, se estimó que este primer banco representó el 81% del genoma de *L. icterohaemorrhagiae*.

### **Producción de un Antisuero Policlonal contra *Leptospira interrogans* serovariedad *icterohaemorrhagiae*.**

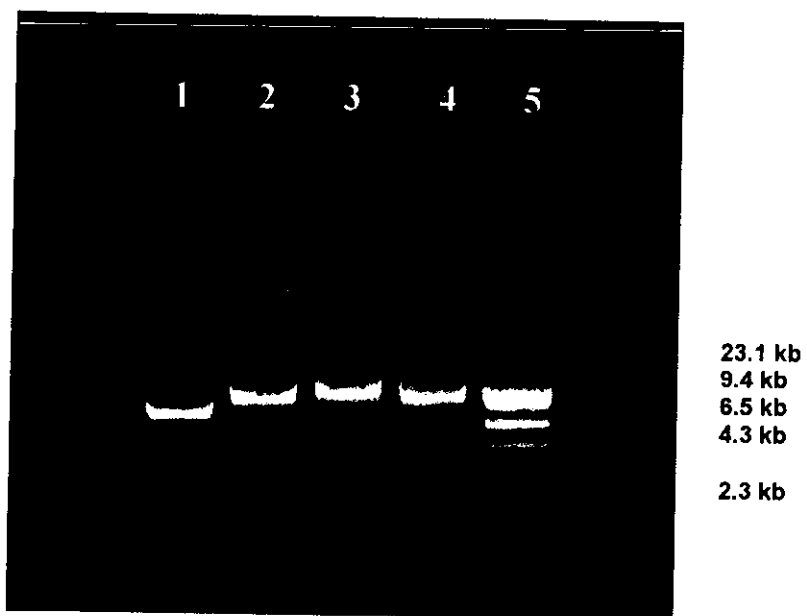
Se demostró por medio de la prueba de AM que los conejos utilizados no presentaban anticuerpos contra *L. interrogans* antes de iniciar las inoculaciones.

Una vez terminado el esquema de inoculación, se determinó mediante la prueba de AM que el antisuero policlonal producido presentaba anticuerpos que reaccionaron únicamente contra *L. icterohaemorrhagiae* con un grado positivo en la dilución 1:50 con ausencia de reacciones cruzadas hacia las otras 18 serovariedades utilizadas. Así mismo, se determinó que el antisuero policlonal producido que alcanzó un título de 1:25,600

### **Selección de Clonas Recombinantes.**

En el primer escrutinio se recuperaron 26 clonas inmunoreactivas (X, 01, 02, 03, 1a, 2a, 2b, 2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 5a, 5b, 5c, 6a, 6b, 6b1, 7a, 9a, 9b, 9c, 9d, 9d1, 9e, 9f).

Después de 5 procesos de selección se obtuvieron 22 posibles candidatos purificados, los cuales representan a 12 de los 26 clonas originales, ya que de algunas clonas se



**FIGURA 10.** Gel de agarosa al 0.7%, donde se muestra ADN de *L. interrogans* serovariedad *icterohaemorrhagiae* (Muestras 2, 3 y 4). El carril 5 corresponde al marcador de peso molecular  $\lambda$  *HindIII*.

recuperaron mas de un candidato debido a lo fuerte de la señal que presentaron. (X'<sub>1</sub>) (01'), (1a', 1a'') (2b''') (3a''') (3b'<sub>1</sub>, 3b''<sub>2</sub>) (3c'''<sub>1</sub>, 3c'''<sub>2</sub>, 3c'''<sub>3</sub>, 3c'''<sub>4</sub>, 3c'''<sub>5</sub>, 3c'''<sub>6</sub>, 3c'''<sub>7</sub>) (4a<sup>x</sup>) (5b''') (7a', 7a'') (9a') (9d''', 9d<sub>1</sub>''') (FIGURAS 11 y 12)

### **Subclonación:**

#### **Escisión *in vivo* del Fagémido pBK-CMV.**

12 de esos 22 candidatos (01'<sub>111</sub>, X'<sub>111</sub>, X'<sub>121</sub>, 1a''<sub>111</sub>, 2b<sup>v</sup><sub>313</sub>, 3b''<sub>111</sub>, 3c'''<sub>231</sub>, 3c<sup>v</sup><sub>211</sub>, 3c<sup>v</sup><sub>6</sub>, 7a''<sub>111</sub>, 3b<sup>11</sup><sub>11</sub>, 3b<sup>11</sup><sub>12</sub>) fueron subclonados al fagémido pBK-CMV generándose así los fagémidos recombinantes pART1, pART2, pART3, pART4, pART5, pART6, pART7, pART8, pART9, ART10, ART13 y ART18).

### **Análisis de Restricción.**

De acuerdo al análisis de restricción realizado a las 12 clonas con las enzimas *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Pst*I, *Sal*I, *Xba*I y *Xho*I, se recuperaron cuatro clonas diferentes, con base en el patrón de cortes observado en los geles de agarosa.

Mediante la digestión con *Eco*RI se demostró la liberación de un fragmento clonado en cada uno de los fagémidos ART seleccionados y por otro lado no se observó diferencia alguna en el patrón de cortes de los mismos (FIGURA13).

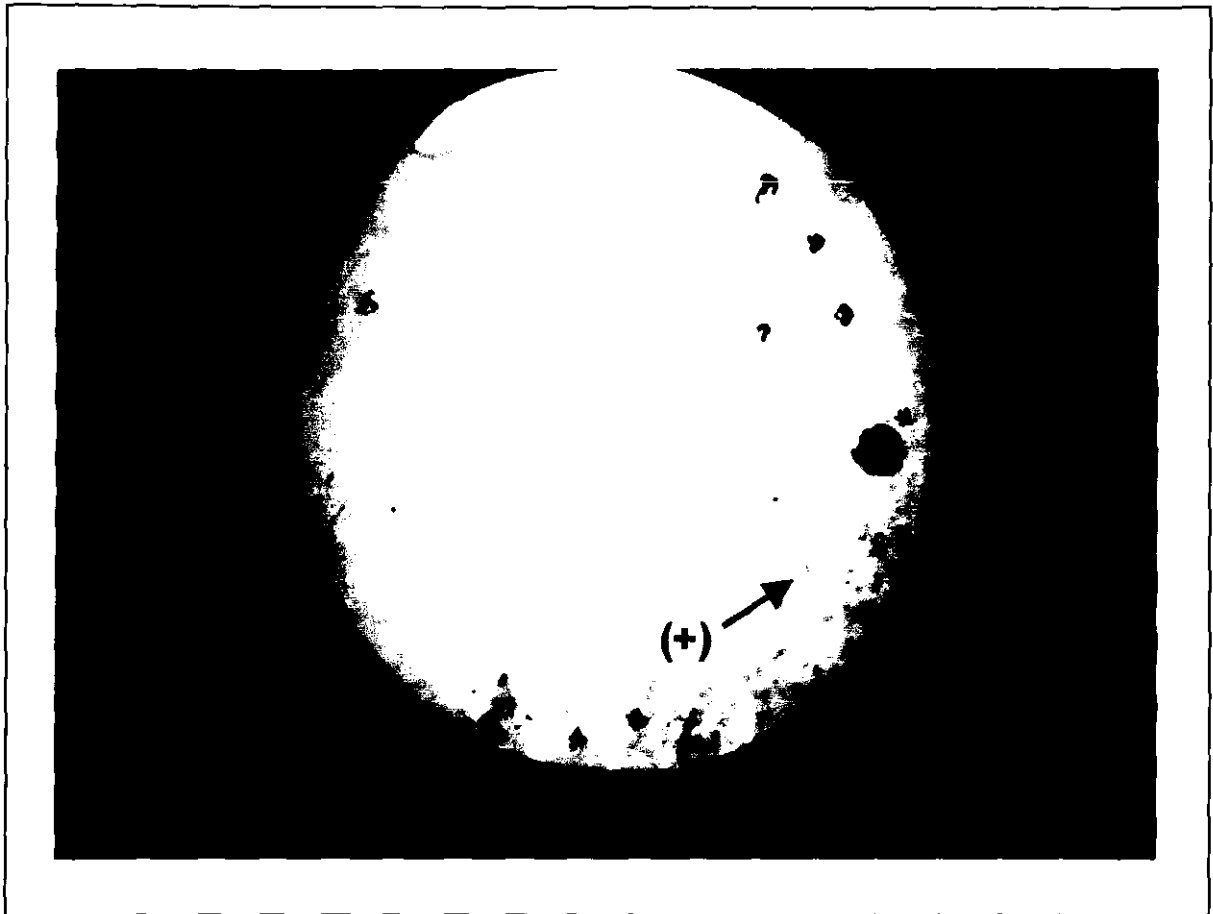
Después de la digestión con *Bam*HI se observó que el fagémido ART18 fue el único que presentó un patrón diferente de cortes en comparación con las otras 11 clonas (FIGURA14).

En la digestión con la enzima *Eco*RV no se observó diferencia alguna entre las 12 clonas (FIGURA 15); mientras que con la enzima *Hind*III se observó un patrón de corte diferente en los fagémidos ART1 y ART18 en comparación a lo observado en los otros 10 fagémidos y entre ellos mismos (FIGURA 16).

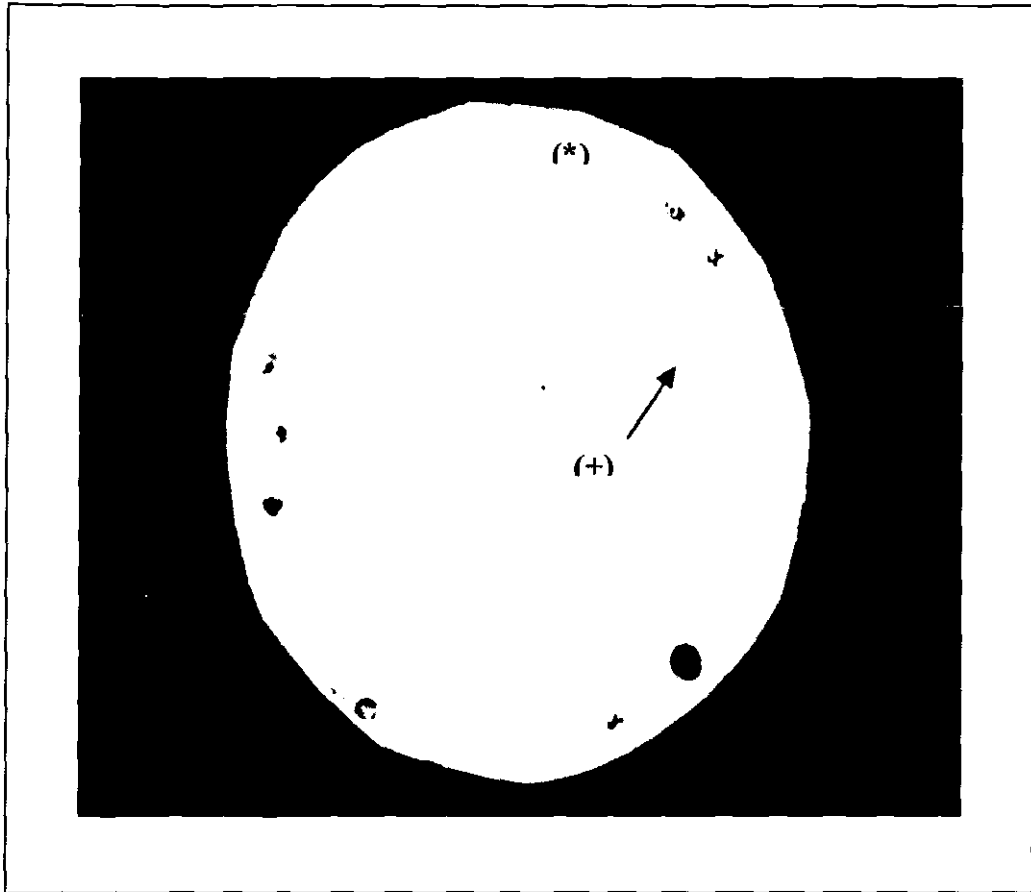
La digestión con *Pst*I reveló que los fagémidos ART1 y ART18 presentaron un patrón diferente de cortes entre ellos y en relación a los otros 10 fagémidos. (FIGURA 17).

En la digestión con *Sal*I no se observó diferencia alguna en el patrón de corte entre las 12 clonas (FIGURA 18)

La digestión con *Sal*I reveló que los fagémidos ART8 y ART13 presentaron un patrón similar entre ellos mismos y diferente al de los otros 10 fagémidos, el fagémido ART18 presentó un patrón de corte diferente al de los fagémidos antes mencionados y al de los otro 9 fagémidos (FIGURA 19).

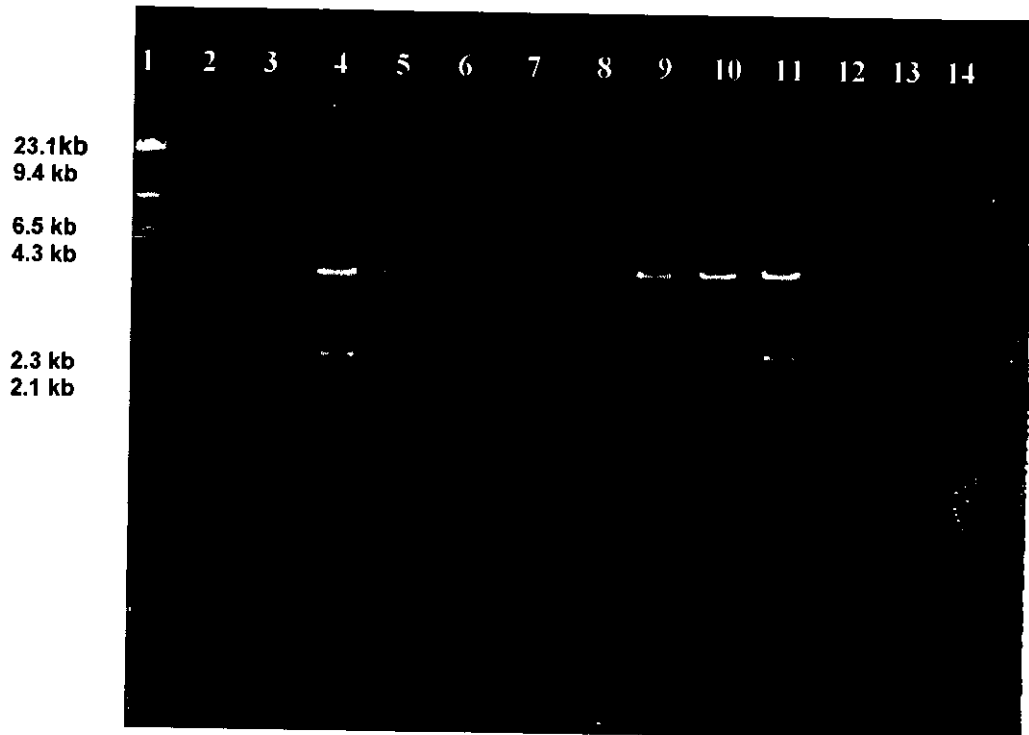


**FIGURA 11.** Membrana de nitrocelulosa donde se observan las reacciones positivas (+) de la clona 6 después de 4 selecciones, utilizando un antisuero policlonal contra la serovariedad *icterohaemorrhagiae*. (\*) Lisado de *L. interrogans* serovariedad *icterohaemorrhagiae* fue utilizado como control positivo.

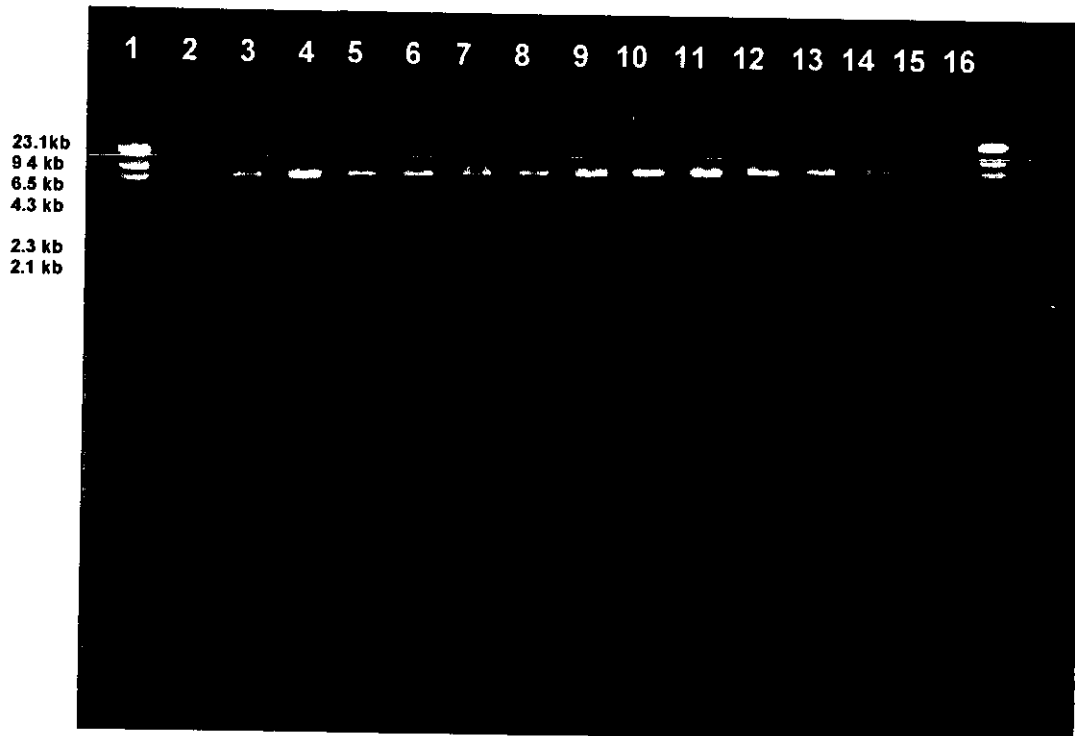


**FIGURA 12.** Membrana de nitrocelulosa donde se observan las reacciones positivas ( —→) después de 5 selecciones de la clona 14, utilizando un antisuero policlonal contra la serovariedad *icterohaemorrhagiae*. (\*) Lisado de *L. interrogans* serovariedad *icterohaemorrhagiae* fue utilizado como control positivo.

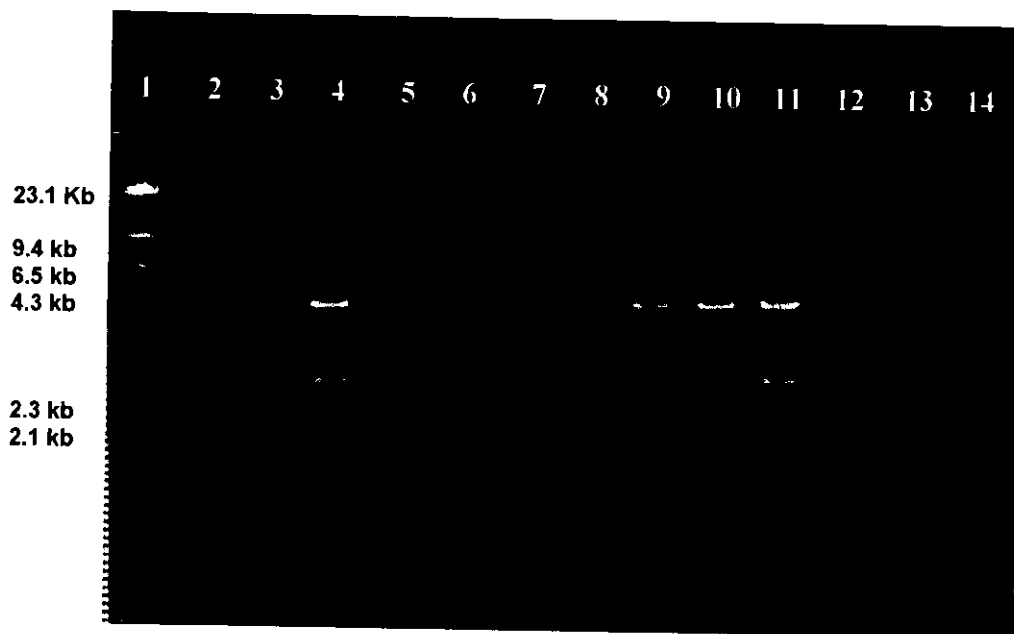




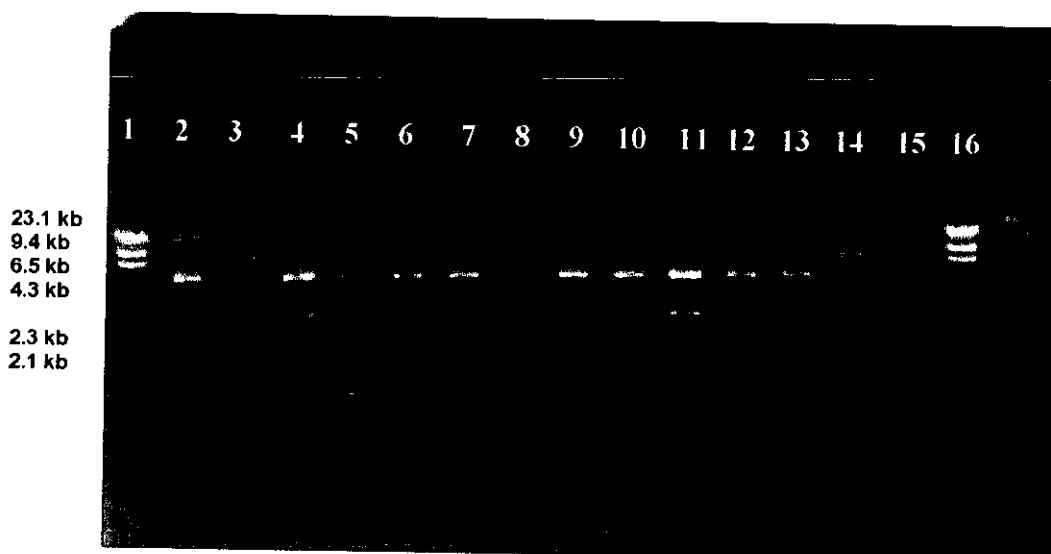
**FIGURA 13.** Gel de agarosa al 1% donde se muestra la digestión con *EcoRI* de los fagémidos recombinantes ART. En el carril 1 se colocó el marcador de peso molecular  $\lambda$  *HindIII*. En el carril 2 se colocó el fagémido pBK-CMV sin digerir. En los carriles 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 se colocaron los fagémidos recombinantes ART1, ART2, ART3, ART4, ART5, ART6, ART7, ART8, ART9, ART10, ART13 Y ART18 digeridos.



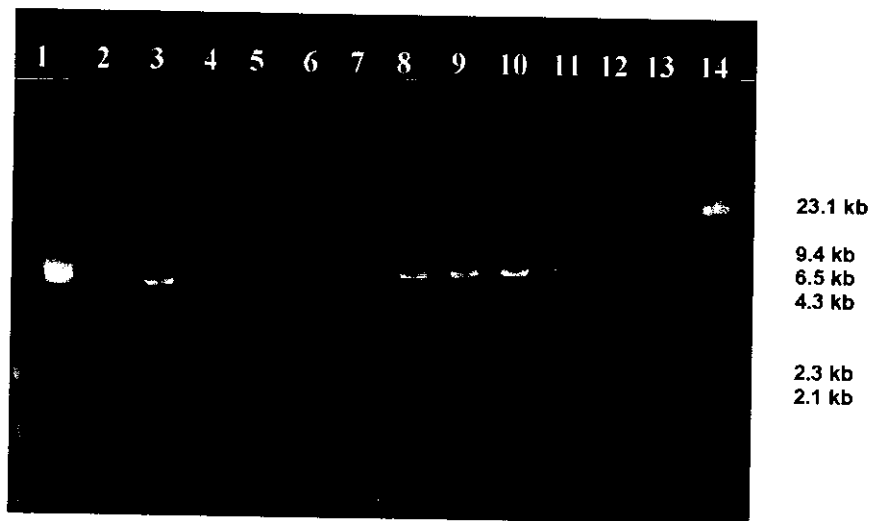
**FIGURA 14.** Gel de agarosa al 1% donde se muestra la digestión con *Bam*HI de los fagémidos recombinantes ART. En el carril 1 y 16 se colocó el marcador de peso molecular  $\lambda$  *Hind*III. En el carril 2 y 15 se colocó el fagémido pBK-CMV sin digerir. En los carriles 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 se colocaron los fagémidos recombinantes ART1, ART2, ART3, ART4, ART5, ART6, ART7, ART8, ART9, ART10, ART13 Y ART18 digeridos.



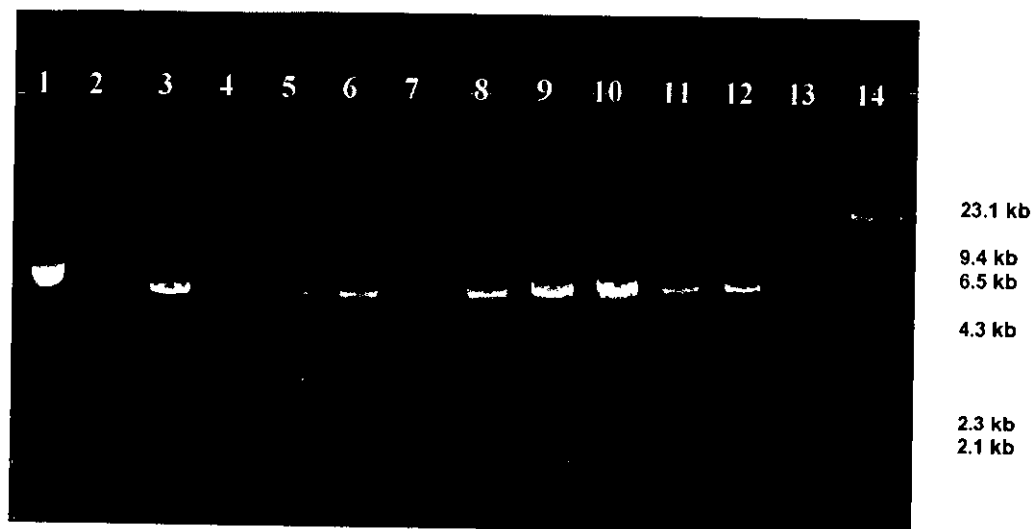
**FIGURA 15.** Gel de agarosa al 1% donde se muestra la digestión enzimática con *EcoRV* de los fagémidos recombinantes ART. En el carril 1 se colocó el marcador de peso molecular  $\lambda$  *HindIII*. En el carril 2 se colocó el fagémido pBK-CMV sin digerir. En los carriles 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,12, 13 y 14 se colocaron los fagémidos ART1, ART2, ART3, ART5, ART6, ART8, ART9, ART 10, ART13 y ART18 digeridos.



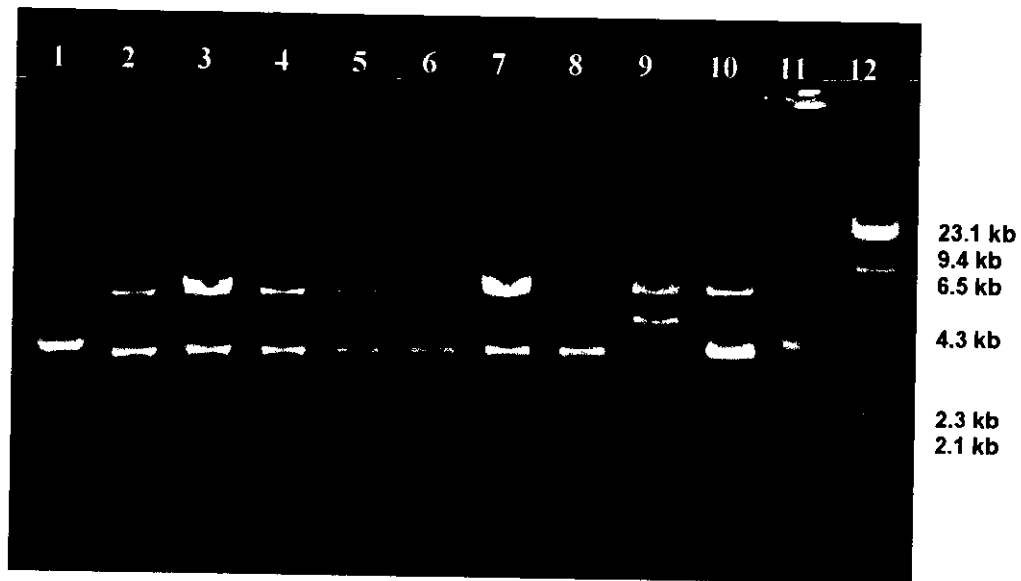
**FIGURA 16.** Gel de agarosa al 1% donde se muestra la digestión con *HindIII* de los fagémidos recombinantes ART. En el carril 1 y 16 se colocó el marcador de peso molecular  $\lambda$  *HindIII*. En el carril 2 y 15 se colocó el fagémido pBK-CMV sin digerir. En los carriles 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 se colocaron los fagémidos recombinantes ART1, ART2, ART3, ART4, ART5, ART6, ART7, ART8. ART9, ART10, ART13 Y ART18 digeridos.



**FIGURA 17.** Gel de agarosa al 1% donde se muestra la digestión con *Pst*I de los fagémidos recombinantes ART. En el carril 1 se colocó el fagémido pBK-CMV sin digerir. En el carril 14 se colocó el marcador de peso molecular  $\lambda$  *Hind*III. En los carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 se colocaron los fagémidos recombinantes ART1, ART2, ART3, ART4, ART5, ART6, ART7, ART8. ART9, ART10, ART13 Y ART18 digeridos.



**FIGURA 18.** Gel de agarosa al 1% donde se muestra la digestión con *Sall* de los fagémidos recombinantes ART. En el carril 1 se colocó el fagémido pBK-CMV sin digerir. En los carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 se colocaron los fagémidos recombinantes ART1, ART2, ART3, ART4, ART5, ART6, ART7, ART8, ART9, ART10, ART13 Y ART18 digeridos. En el carril 14 se colocó el marcador de peso molecular  $\lambda$  *HindIII*.



**FIGURA 19.** Gel de agarosa al 1% donde se muestra la digestión con *ScaI* de los fagémidos recombinantes ART. En el carril 1 se colocó el fagémido pBK-CMV sin digerir. En los carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 se colocaron los fagémidos recombinantes ART8, ART3, ART4, ART5, ART6, ART7, ART9, ART18, ART13 Y ART10 digeridos. En el carril 14 se colocó el marcador de peso molecular  $\lambda$  *HindIII*.

En la digestión con *Xba*I únicamente el fagémido ART18 mostró un patrón de corte diferente en relación a los otros 11 fagémidos (FIGURA 20).

En la digestión con *Xho*I los 12 fagémidos presentaron el mismo patrón de restricción (FIGURA 21).

Los fragmentos clonados tuvieron un tamaño que va de 2500 a 3000 pb.

Posterior al análisis de restricción, se eligió al azar al fagémido recombinante ART9, el cual fue nuevamente digerido con la enzima *Eco*RI para ratificar la existencia del fragmento clonado antes de realizar la secuenciación. Después de la digestión se confirmó la liberación de un fragmento correspondiente al ADN de *L. icterohaemorrhagiae* de aproximadamente 2500 pb, el cual fue purificado mediante perlas de silica y remitido al Instituto de Biotecnología de Cuernavaca para realizar la secuenciación del mismo (FIGURA 22).

### Secuenciación del Fragmento Clonado.

El fragmento purificado fue secuenciado mediante el uso de los iniciadores universales T3 y T7, los cuales forman parte del fagémido pBK-CMV. Posterior a la secuenciación se diseñaron iniciadores de afuera hacia adentro en ambos sentidos con ayuda del programa OMIGA 1.1 para continuar la secuenciación de los genes contenidos en dicho fragmento (CUADRO 2).

**CUADRO 2. Iniciadores utilizados para secuenciar el fragmento.**

Fragmento	Secuencia	Nucleotidos	%G-C	Temperatura
ART9 con T3	GTGCCCTGAATGAACTGC	18	55.6	57.6
ART9 con T7	TTGCCGGATCAAGAGCTACC	20	55.0	62.6

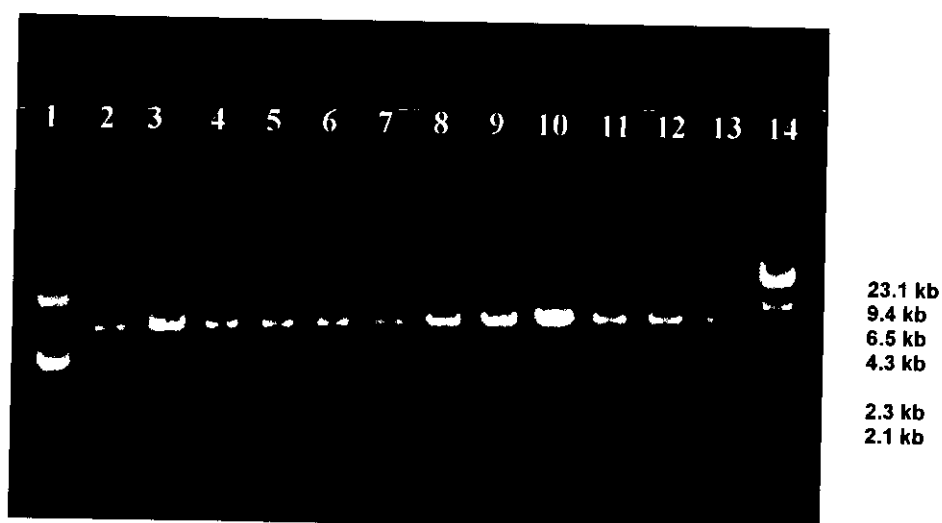
La secuenciación parcial del fragmento reveló 3 posibles marcos abiertos de lectura (**MAL**).

### Análisis de la Secuencia de Nucleotidos.

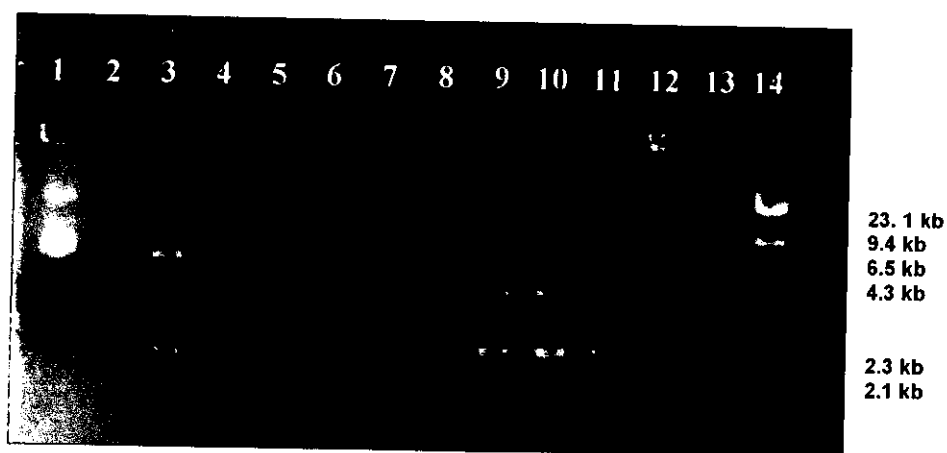
El análisis de las secuencias aisladas se llevó a cabo mediante una comparación con la base de datos del Banco de Genes (*GenBank*).

En la dirección 3' del fragmento se localizó un codón de término de la traducción (**TGA**) en la posición 354, mostrando el posible **MAL** I incompleto de 356 pb, que codifica para una proteína de 95 aa. Este **MAL** mostró una identidad del 99% y una similitud del 99% con una transposasa Tn5 (FIGURAS 23 y 24).

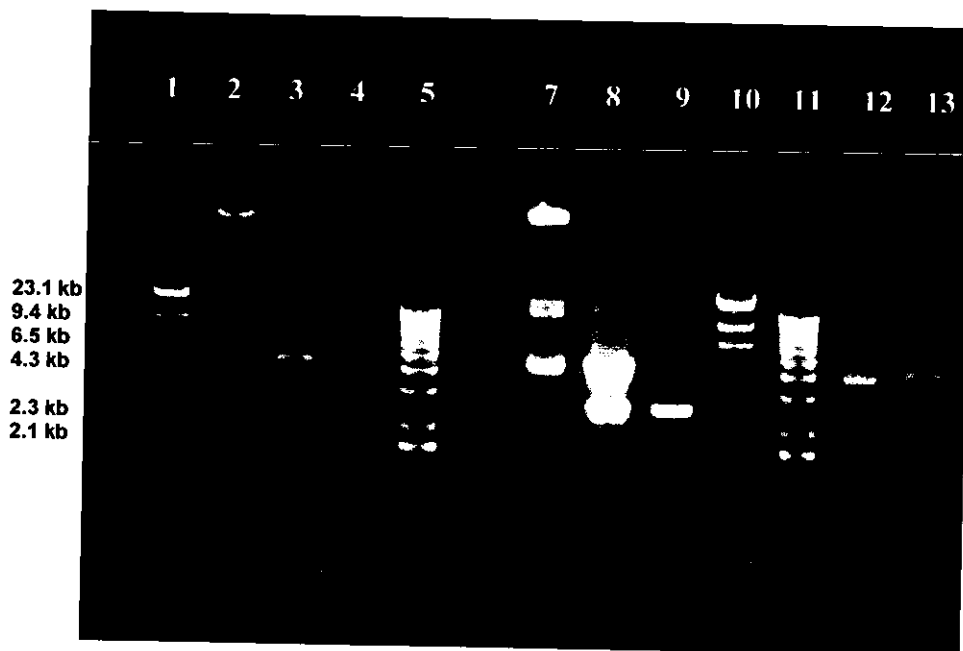




**FIGURA 20.** Gel de agarosa al 1% donde se muestra la digestión con *Xba*I de los fagémidos recombinantes ART. En el carril 1 se colocó el fagémido pBK-CMV sin digerir. En los carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 se colocaron los fagémidos recombinantes ART1, ART2, ART3, ART4, ART5, ART6, ART7, ART8, ART9, ART10, ART13 Y ART18 digeridos. En el carril 14 se colocó el marcador de peso molecular  $\lambda$  *Hind*III.



**FIGURA 21.** Gel de agarosa al 1% donde se muestra la digestión con *Xho*I de los fagémidos recombinantes ART. En el carril 1 se colocó el fagémido pBK-CMV sin digerir. En los carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 se colocaron los fagémidos recombinantes ART1, ART2, ART3, ART4, ART5, ART6, ART7, ART8, ART9, ART10, ART13 Y ART18 digeridos. En el carril 14 se colocó el marcador de peso molecular  $\lambda$  *Hind*III.



**FIGURA 22.** Gel de agarosa al 1% donde se muestra la digestión con *EcoRI* de los fagémidos recombinantes pBK-CMV y ART. En el carril 1 se colocó el marcador de peso molecular  $\lambda$  *HindIII*. En el carril 2 se colocó el fagémido ART9 sin digerir. En el carril 3 se colocó el fagémido ART9 digerido. En el carril 4 se colocó el inserto de ADN purificado. En el carril 5 se colocó el marcador de peso molecular *Ladder* de 1 Kb.

A: 31 SFTLPQALRAQGLLKEAEHVESQSAETVLTTPDECQLLGYLDKGKRKRKEKAGSLQWAYMA 210  
SFTLPQALRAQGLLKEAEHVESQSAETVLTTPDECQLLGYLDKGKRKRKEKAGSLQWAYMA  
B: 373 SFTLPQALRAQGLLKEAEHVESQSAETVLTTPDECQLLGYLDKGKRKRKEKAGSLQWAYMA 432

A: 211 IARLGGFMSKRTGIASWGALW\*GWEALQSKLDGFLLAAKDLMAQGIKI 354  
IARLGGFMSKRTGIASWGALW GWEALQSKLDGFLLAAKDLMAQGIKI  
B: 433 IARLGGFMSKRTGIASWGALWEGWEALQSKLDGFLLAAKDLMAQGIKI 480

Identidad: 99%.

Similitud: 99%.

A: *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

B: Transposasa Tn5.

FIGURA 23. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos entre el MAL I y la transposasa Tn5.

**FIGURA 24. ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS DE UN GENE DE *Leptospira icterohaemorrhagiae* (MAL I) PRESENTE EN LA CLONA ART9-T3 Y LA RESPECTIVA PREDICCIÓN DE AMINOÁCIDOS DE LA TRANSPOSASA Tn5.**

```

A:          30  aagcttcacgctgccgcaagcactcagggcgcaagggctgctaaaggaagcggaacacgt  89
              |||
B:          1196 aagcttcacgctgccgcaagcactcagggcgcaagggctgctaaaggaagcggaacacgt 1255
transposasa 369  SerPheThrLeuProGlnAlaLeuArgAlaGlnGlyLeuLeuLysGluAlaGluHisVa

A:          90  agaaagccagtcgagcagaaacgggtgctgaccccgatgaatgtcagctactgggctatct 149
              |||
B:          1256 agaaagccagtcgagcagaaacgggtgctgaccccgatgaatgtcagctactgggctatct 1315
transposasa 389  lGluSerGlnSerAlaGluThrValLeuThrProAspGluCysGlnLeuLeuGlyTyrLe

A:          150  ggacaagggaaaacgcaagcgcaaagagaaaagcaggtagcttgagctgggcttacatggc 209
              |||
B:          1316 ggacaagggaaaacgcaagcgcaaagagaaaagcaggtagcttgagctgggcttacatggc 1375
transposasa 409  uAspLysGlyLysArgLysArgLysGluLysAlaGlySerLeuGlnTrpAlaTyrMetAl

A:          210  gatagctagactgggcggttttatggacagcaagcgaaccggaattgccagctggggcgc 269
              |||
B:          1376 gatagctagactgggcggttttatggacagcaagcgaaccggaattgccagctggggcgc 1435
transposasa 429  aIleAlaArgLeuGlyGlyPheMetAspSerLysArgThrGlyIleAlaSerTrpGlyAl

                ***

A:          270  cctctggtaaggttgggaagccctgcaaagtaaaactggatggcttcttgccgccaagga 329
              |||
B:          1436 cctctgggaaggttgggaagccctgcaaagtaaaactggatggcttcttgccgccaagga 1495
transposasa 449  aLeuTrpGluGlyTrpGluAlaLeuGlnSerLysLeuAspGlyPheLeuAlaAlaLysAs

A:          330  tctgatggcgaggggatcaagatctgatcaagagacag 368
              |||
B:          1496 tctgatggcgaggggatcaagatctgatcaagagacag 1534
transposasa 469  pLeuMetAlaGlnGlyIleLysIle^^^

```

**Identidad: 99%.**

**A: *Leptospira icterohaemorrhagiae*.**

**B: Transposasa Tn5.**

En la misma dirección se localizó un codón de término de la traducción (TGA) en la posición 143, mostrando el posible MAL II incompleto de 602 pb, que codifica para una proteína de 200 aminoácidos (aa). Este MAL mostró una identidad que va del 85% al 94% y una similitud del 85% con la enzima cutinasa de *Phytophthora capsici* (Figuras 25 y 26).

**A:** 689 PAPGXRPIASQSLXGFKXQORRAQLRKERPSWPATIAAXPRPAVHSGHRTGRS\*QKEPGAP 510  
 PAP RPIA+ S + QORRA +RKERPSWPATIAA PRPAVHSGHRTGRS QKEPG P  
**B:** 33 PAPALRPIAA-SPFPLQCORRAHVVRKERPSWPATIAALPRPAVHSGHRTGRSCQKEPG-P 90

**A:** 525 RTGRPC-----ADSRNTAASEQPIVCCAQS\*PNSLSTQAAGEPACNPSCSIMRNDPHPV 364  
 RTGR C A RNTAASEQPIVCCAQS PN LSTQAAGEPACNPSCSIMRNDPHPV  
**B:** 79 RTGRSCQKEPGPACQRNTAASEQPIVCCAQSYPNCLSTQAAGEPACNPSCSIMRNDPHPV 138

**A:** 363 S\*SDLDPLRHQILGGKKAIQFTLQGFPTLPEGAPAGNSGSLAVHKTAQS 217  
 S SDL PL QILGGKKAIQFTLQGFPTLPEGAPAGNSGSLAVH TAQS  
**B:** 139 SCSDLVPLYSQILGGKKAIQFTLQGFPTLPEGAPAGNSGSLAVHITAQS 187

**A:** 214 LSPCKPTASYLLSLCACVFP 155  
 LSPC ASYLL FP  
**B:** 188 LSPCMDASYLLCALRLRFP 207

**Identidad: 85%.**

**Similitud: 85%.**

**A:** *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

**B:** *Phytophthora capsici*.

**FIGURA 25.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos entre el MALII y la cutinasa de *Phytophthora capsici*.

**FIGURA 26. ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS DE UN GENE DE *Leptospira icterohaemorrhagiae* (MAL II) PRESENTE EN LA CLONA ART9-T3 Y LA RESPECTIVA PREDICCIÓN DE AMINOÁCIDOS DE LA CUTINASA DE *Phytophthora capsici*.**

```

A:      53  tcagggcgcaagggctgctaaaggaagcggaacacgtagaaaagccagtcgagaaacgg 112
          |||
B:      934  tcagggcgcaagggctgctaaaggaagcggaacacgtagaaaagccagtcgagaaacgg 875

A:      113  tgctgaccccgatgaatgtcagctactgggctatctggacaagggaaaacgcaagcgca 172
          |||
B:      874  tgctgaccccgatgaatgtcagctactgggctatctggacaagggaaaacgcaagcgca 815
cutinasa 202
          ^^^ArgSerLeuProPheArgLeuArgLe

          Ser                      ThrProLys                      Lys
A:      173  aagag-aaagcaggtagcttgcagtgaggcttacatggcgatagctagactgggcggtttt 231
          ||| | |||
B:      814  aagcgcaaagcaggtagcttgcagtcaggtcatacatggcgatag--agactgggcggttat 757
cutinasa 201  uAlaCysLeuLeuTyrSerAlaAspThrMetCysProSerLeu SerGlnAlaThrIle

A:      232  atggacagcaagcgaaccggaattgccagctggggcgccctctggtaaggttggaagcc 291
          |||
B:      756  atggacagcaagcgaaccggaattgccagctggggcgccctctggtaaggttggaagcc 697
cutinasa 163  HisValAlaLeuSerGlySerAsnGlyAlaProAlaGlyGluProLeuThrProPheGly

          HisArg                      Asp
A:      292  ctgcaaagtaaactggatggctttcttggcccaaggatctgatggcgaggggatcaag 351
          |||
B:      696  ctgcaaagtaaactggatggctttcttggcccaaggatctgactgtacaggggaacaag 637
cutinasa 143  GlnLeuThrPheGlnIleAlaLysLysGlyGlyLeuIleGlnSerTyrLeuProValLeu

          ***

A:      352  atctgatcaagagacaggatgaggatcgtttcgcatgattgaacaagatggattgcacgc 411
          |||
B:      636  atctgaacaagagacaggatgaggatcgtttcgcatgattgaacaagatggattgcacgc 577
cutinasa 123  AspSerCysSerValProHisProAspAsnArgMetIleSerCysSerProAsnCysAla

          Ser                      Ser
A:      412  aggttctccggccgcttgggtggagaggctattcggtatgactgggcacacagacaat 471
          |||
B:      576  aggttctccggccgcttgggtggagaggcaattcgataagactgggcacacagacaat 517
cutinasa 103  ProGluGlyAlaAlaGlnThrSerLeuCysAsnProTyrSerGlnAlaCysCysValIle

          Asp
A:      472  cggtgctctgatgccgccgtgtccggctgtcagcgcagggcgcccggttctttttgt 531
          |||
B:      516  cggtgctctgatgccgccgtgtcc-gctgaca-cgcagg---gccggttctttttga 462
cutinasa 94  ProGlnGluSerAlaAlaThrAsnArgSerVal AlaPro GluProGluLysGlnC

A:      532  caagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactgcaggacgaggcancgaggctatcggtg 591
          |||
B:      461  caagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactgcaggacgaggcagcggctatcggtg 402
cutinasa 65  ysSerArgGlyThrArgHisGlySerHisValAlaProArgProLeuAlaAlaIleThrA

          LeuGln                      Val
A:      592  gctggccacgacgggcttccttgcgcaactgtgctcgcagcttgncaacttgaaccggna 651
          |||

```

B: 401 gctggccacgacggggcgttccttgcgacgtgtgctcgacggttgacact--gaagcggga 344  
 cutinasa 48 laProTrpSerProArgGluLysArgValHisAlaArgArgGlnCysGln LeuProPh

Gly

A: 652 agggactggccttgctattggggcgaantcccggngcaggat 691  
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

B: 343 agggactggc-tgctattggggcgaagtgccggggcaggat 305  
 cutinasa 42 eProSerAla AlaIleProArgLeuAlaProAlaProAsp

Identidad: 94%.

A: *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

B: *Phytophthora capsici*.

En dirección 5' se localizó un codón de término de la traducción (TAA) en la posición 144, mostrando un posible MAL III incompleto de 189 pb, que codifica para una proteína de 46 aa. Este MAL incompleto reveló una homología con una β-lactamasa resistente a inhibidores TEM-79 de *E. coli*, observándose una identidad del 100% y una similitud del 100% (FIGURAS 27 y 28).

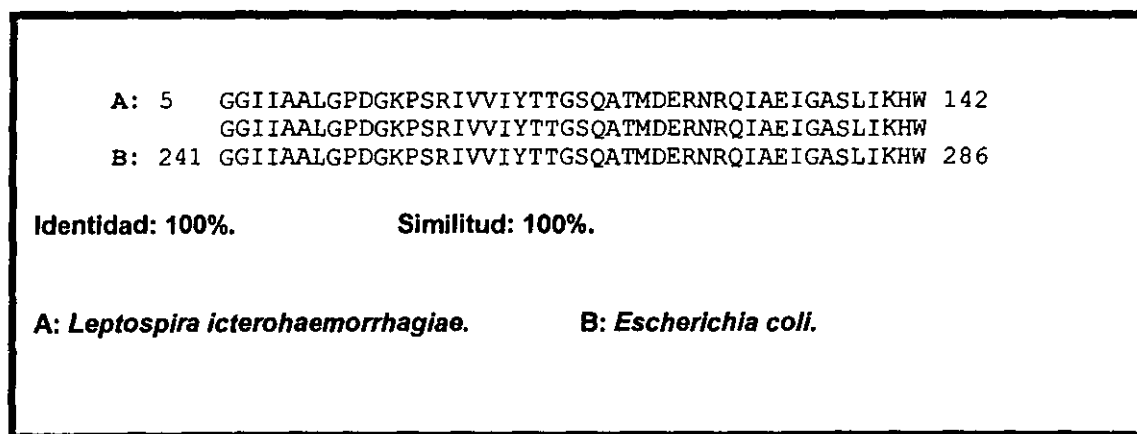


FIGURA 27. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del MALIII y la β-lactamasa TEM-79 de *E. coli*.



**FIGURA 28. ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS DE UN GENE DE *Leptospira icterohaemorrhagiae* (MAL III) PRESENTE EN LA CLONA ART9-T7 Y LA RESPECTIVA PREDICCIÓN DE AMINOÁCIDOS DE LA  $\beta$ -LACTAMASA TEM-79 DE *Escherichia coli*.**

```

A:                5      ggcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctac 64
                   |||
B:                929    ggcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctac 988
inhibitor-resistant beta-lactam> 241 GlyGlyIleIleAlaAlaLeuGlyProAspGlyLysProSerArgIleValValIleTyr

A:                65      acgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcc 124
                   |||
B:                989    acgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcc 1048
inhibitor-resistant .beta-lactam> 261 ThrThrGlySerGlnAlaThrMetAspGluArgAsnArgGlnIleAlaGluIleGlyAla

A:                125    tcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatataactttaga 179
                   |||
B:                1049   tcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatataactttaga 1103
inhibitor-resistant beta-lactam> 281 SerLeuIleLysHisTrp^^^

```

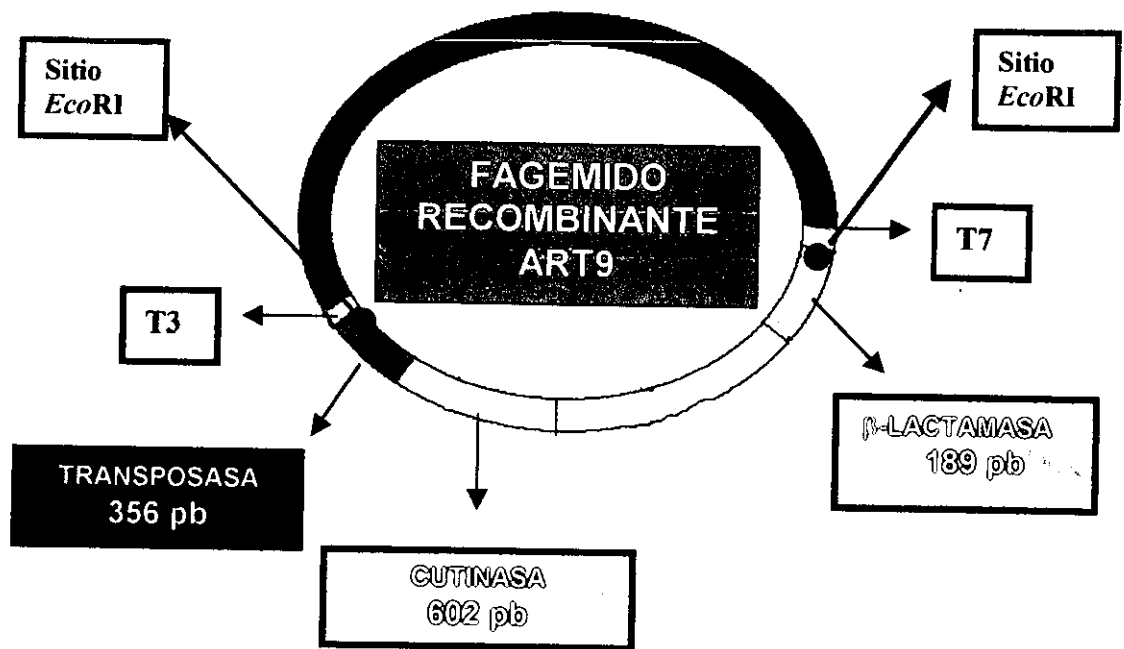
**Identidad: 100%.**

**A: *Leptospira icterohaemorrhagiae*.**

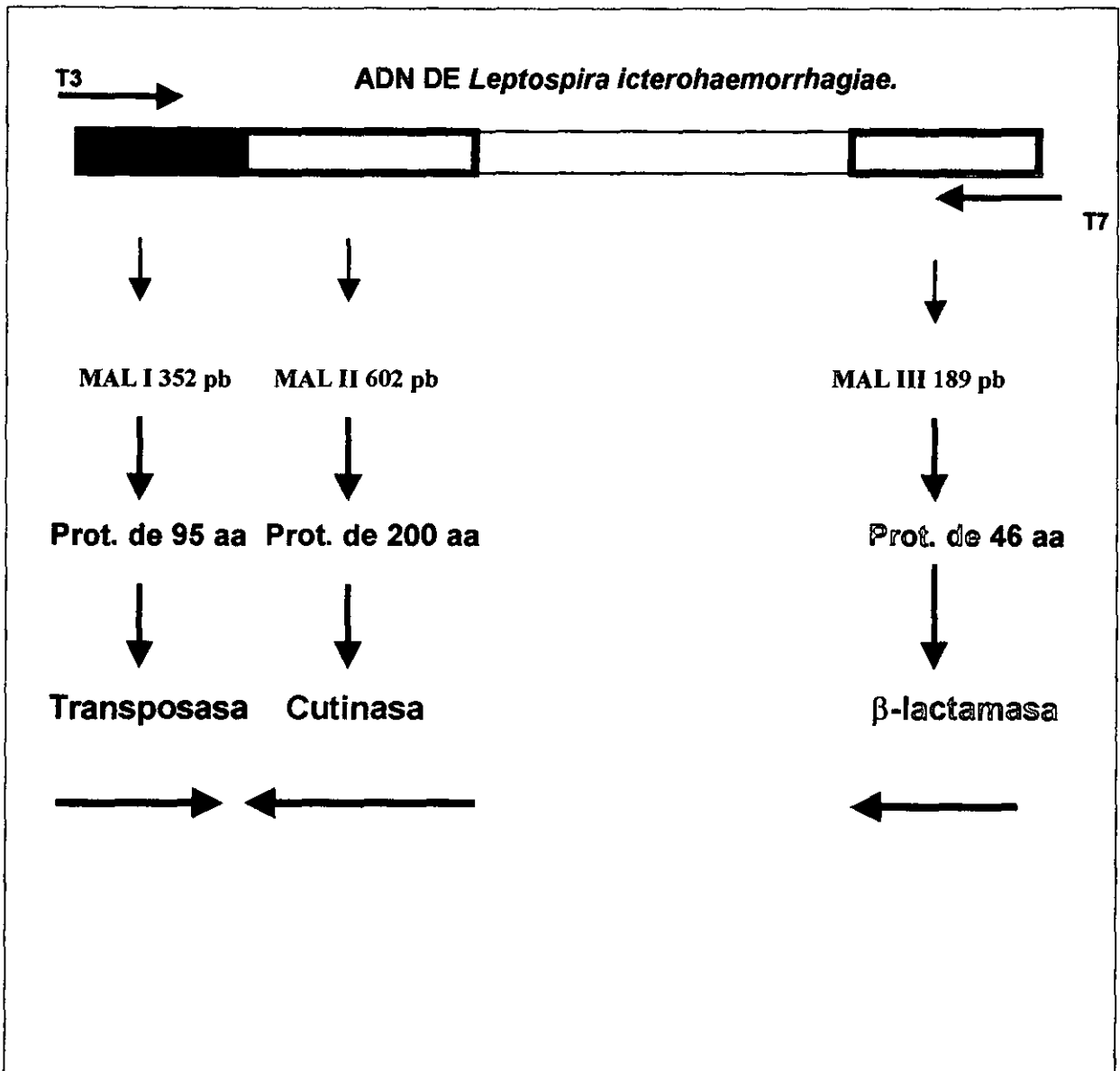
**B: *Escherichia coli*.**

La representación gráfica de fagémido recombinante ART9, así como la localización y orientación de los marcos abiertos de lectura clonados se muestran en las FIGURAS 29 y 30.

Al comparar la secuencia de aminoácidos de la cutinasa de *Phytophthora capsici* con la predicción de aminoácidos correspondiente al gene clonado de *Leptospira icterohaemorrhagiae*, se determinó que ambas proteínas difieren en 18 aminoácidos (Cuadro 3).



**FIGURA 29. MAPA DEL FAGÉMIDO RECOMBINANTE ART9 QUE MUESTRA LA UBICACIÓN DE LOS GENES CLONADOS.**



**FIGURA 30. LOCALIZACIÓN Y ORIENTACIÓN DE LOS MARCOS ABIERTOS DE LECTURA (MAL) CLONADOS EN EL FAGÉMIDO ART9 .**

**CUADRO 3. VARIACIÓN DE NUCLEOTIDOS Y AMINOÁCIDOS ENTRE EL GENE DE LA CLONA ART9-T3 Y EL GENE DE LA CUTINASA.**

MICOORGANISMO	NUCLEOTIDO		AMINOÁCIDOS	GRUPO
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	177	A	Serina	Polar
<i>P. capcisi</i>	810	C	Alanina	No polar
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	197	G	Treonina	Polar
<i>P. capcisi</i>	791	T	Acido Aspartico	Acido
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	198	T	Treonina	Polar
<i>P. capcisi</i>	790	C	Acido Aspartico	Acido
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	201	G	Prolina	No polar
<i>P. capcisi</i>	787	T	Treonina	Polar
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	203	T	Lisina	Básico
<i>P. capcisi</i>	785	A	Metionina	No polar
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	229	T	Lisina	Básico
<i>P. capcisi</i>	759	A	Isoleucina	No polar
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	334	T	Histidina	Básico
<i>P. capcisi</i>	654	C	Serina	Polar
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	335	G	Histidina	Básico
<i>P. capcisi</i>	653	T	Serina	Polar
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	337	C	Arginina	Básico
<i>P. capcisi</i>	651	T	Tirosina	Polar-Aromático
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	638	G	Arginina	Básico
<i>P. capcisi</i>	650	A	Tirosina	Polar-Aromático
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	346	T	Acido Aspartico	Acido
<i>P. capcisi</i>	642	A	Valina	No polar
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	359	T	Serina	Polar
<i>P. capcisi</i>	629	A	Cisteina	No polar
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	450	T	Serina	Polar
<i>P. capcisi</i>	538	A	Serina	Polar
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	502	T	Acido Aspartico	Acido
<i>P. capcisi</i>	441	A	Valina	No polar
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	621	A	Leucina	No polar
<i>P. capcisi</i>	376	C	Valina	No polar
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	622	C	Glicina	Polar
<i>P. capcisi</i>	375	G	Histidina	Básico
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	645	C	Valina	No polar
<i>P. capcisi</i>	350	G	Leucina	No polar
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	678	C	Glicina	No polar
<i>P. capcisi</i>	317	G	Alanina	No polar

## DISCUSIÓN.

Al analizar la secuencia de la clona seleccionada, en dirección 3' se encontró una homología con un gene que codifica para la enzima cutinasa de *Phytophthora capsici*, con una identidad del 85% y una similitud del 85%. En la misma dirección, se encontró homología pero en diferente marco abierto de lectura (MAL) con una transposasa Tn5 de *E. coli*, con una identidad del 99% y una similitud del 99%.

La primer enzima con actividad cutinolítica fue descrita en *Penicillium spinulosum* y se pensaba que esta enzima era exclusiva de este género. Sin embargo, ahora se sabe que enzimas con actividad de cutinasa son producidas por una gran variedad de hongos patógenos y algunas bacterias entre las que destaca *Pseudomonas*.<sup>106,107</sup> Aunque muchos hongos patógenos de plantas penetran a través de heridas presentes en la cubierta externa, algunos invaden por penetración directa a través de la superficie intacta de la planta. Para ello utilizan una enzima llamada cutinasa la cual es capaz de hidrolizar los enlaces ester en el polímero de cutina (ácido monocarboxílico con series de 16 y 18 átomos de carbono, así como dos a tres grupos hidroxilo), la cual es el principal componente de la capa cuticular de la planta. Otra función descubierta para la cutinasa, es promover la adhesión de las esporas del hongo que la produce, a la superficie hidrofóbica de la planta.<sup>107,108</sup>

La cutinasa es una pequeña enzima lipasa/estearasa, que pertenece a la clase de las serina-estearasas y a la familia  $\alpha/\beta$ -hidrolasas, dentro de la cual se encuentran diversas lipasas.<sup>109</sup> Tiene como sitio activo a la triada catalítica (serina 120, ácido aspártico 175 e histidina 188) y un sitio de unión oxianión que consiste de dos cadenas principales con átomos de nitrógeno (serina 42 N y glutamina 121 N). El grupo hidroxilo de la serina 42 es mantenido en la orientación apropiada mediante dos puentes de hidrógeno, uno a la asparagina 84 y otro a la glutamina 121.<sup>107</sup>

La homología estructural entre la cutinasa y otras lipasas se ilustra con las siguientes observaciones:

- 1) La lamina  $\beta$  central de la cutinasa se sobrepone correctamente con 3 a 7 cadenas de la lamina central de la lipasa de *Rhizomucor miehei* y la lipasa pancreática humana; 2) Esta sobreposición de las laminas  $\beta$  también se da con átomos de la triada que participan en los procesos catalíticos (serina 120 O $\gamma$ , ácido aspártico 175 O  $\delta$ 1, histidina 188 N  $\delta$ 1); 3) La serina catalítica de la cutinasa (ser 120) presenta una conformación  $\epsilon$  energéticamente desfavorable, la cual también

ha sido encontrada en las serinas catalíticas de otras lipasas y es una característica de los residuos nucleofílicos de todas las enzimas de la clase  $\alpha/\beta$  hidrolasas.<sup>109,110</sup>

La cutinasa muestra una actividad de endohidrolasa y exohidrolasa que es específica para ésteres de alcohol primarios, que son los ésteres dominantes en el polímero de cutina. La transcripción del gene de cutinasa es reprimida por glucosa y activada por los monómeros de cutina.<sup>107</sup> Las cutinasas son también capaces de hidrolizar una gran variedad de ésteres sintéticos y muestran una actividad directa sobre cadenas cortas y largas de ácidos grasos emulsificados tan eficientemente como la lipasa pancreática. Son activas sobre triglicéridos solubles y emulsificados.<sup>111</sup> La actividad de la cutinasa es muy sensible al tamaño y distribución de los grupos acilo en las cadenas.<sup>112</sup>

Contrario a otras lipasas, la actividad de la cutinasa se incrementa en la presencia de una interfase lípido-agua.<sup>111</sup> Para tratar de definir el papel de la cutinasa en relación a la virulencia, se implementaron tres diferentes estrategias *in vitro*. Primero se determinó que una cepa mutante de *Colletotrichum gloeosporioides*, con una actividad disminuida de la cutinasa, no logró la infección de la planta.<sup>113</sup> Con un segundo experimento se demostró que la adición de anticuerpos específicos contra la cutinasa impedían la infección de una cepa altamente virulenta de *Fusarium solani*.<sup>114</sup> Finalmente, el uso de inhibidores químicos de la cutinasa, tales como el diisopropilfluorofosfato y los organofosforados, previnieron la infección de hongos patógenos. Estos resultados demuestran que la hidrólisis enzimática de la cutinasa tiene una participación importante en la patogénesis.<sup>113,114,115</sup>

Por otra parte, el gene de cutinasa de *Nectria haematococca* ha sido transformado dentro de el hongo patógeno *Mycosphaerella sp.*, el cual solo infecta a la papaya cuando la superficie externa presenta lesiones. La cepa transformada fue capaz de expresar el gene donado con diferentes tasas de transcripción, la síntesis de la enzima cutinasa le permitió infectar a su huésped sin requerir la presencia de lesiones previas. Los diferentes tamaños de las lesiones resultantes, fueron considerados como un indicativo de la actividad de la cutinasa en las transformantes. De esta forma, nuevamente se demostró que el gene de la cutinasa era esencial para permitir la penetración de *Mycosphaerella sp.* en papayas con la cutícula intacta.<sup>116</sup>

La cepa T-8 de *Fusarium solani* con la capacidad de producir la enzima cutinasa activa fue sometida a proceso de mutagénesis con luz ultravioleta para generar una mutante PBN-1. Después de haber cultivado a la mutante durante 3 a 5 días en medios conteniendo cutina, se determinó que la mutante obtenida mostró una reducción en la actividad de la cutinasa de un 80 a un 90%. De igual forma, mediante la técnica de Western blot se demostró que la mutante presentó una reducción del 85% en la intensidad de la banda correspondiente a la cutinasa (peso

molecular de 22 KDa), debido a una disminución en la expresión de cutinasa. La virulencia de la mutante en comparación con la cepa original presentó una disminución del 55%. Estos resultados sugieren que la cepa mutante sintetizó cantidades reducidas de cutinasa funcional e inmunoreactiva y que la cutinasa juega un papel importante en el proceso de infección.<sup>117</sup>

Para evaluar el impacto de un cambio en una región constante se llevó a cabo una mutagénesis dirigida en el aminoácido asparagina 84, el cual dirige la orientación apropiada de la serina 42 O $\gamma$ , por alanina. Las modificaciones bioquímicas se evaluaron con respecto a su habilidad para hidrolizar el p-nitrofenilbutirato en solución, dado que la cutinasa es capaz de hidrolizar este sustrato. La mutante S42A mostró un drástico decremento en la actividad (450 veces menor), sin afectar la estructura tridimensional y la geometría del sitio activo que consiste de la triada catalítica ser120, asp175 e his188.<sup>118</sup>

Si bien, la sustitución de un solo aminoácido por otro en una sucesión de aminoácidos, puede modificar por completo la conformación de la proteína, su actividad biológica o su antigenicidad, siempre y cuando el cambio se presente en una región altamente conservada. Un cambio en una región variable o un cambio entre aminoácidos con características similares es muy probable que no modifique la estructura ni función de la proteína.<sup>119</sup>

Al comparar la estructura primaria deducida de la cutinasa en 3 diferentes hongos patógenos para plantas (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum capsici* y *Fusarium solani*), Ettinger *et al.*, determinaron que solo el 43% de los residuos son conservados entre las tres enzimas, mientras que el resto de las regiones pueden mostrar una variabilidad considerable. Los residuos involucrados en la triada catalítica y uniones disulfuro en las tres cutinasas son regiones altamente conservadas.<sup>120</sup>

Al comparar la preferencia en el uso de codones entre las cutinasas de *C.capsici* y *C.gloeosporioides*, se determinó que había diferencias entre ambas. De los 61 codones que codifican para los diferentes aminoácidos, 13 codones no son usados en *C. capsici* y 18 codones no son usados en *C.gloeosporioides*. En el caso de la cutinasa de *Neurospora* hay una fuerte preferencia sobre A en la tercera posición de los codones utilizados. De cualquier forma, este nivel de preferencia es bastante moderado para hongos filamentosos.

Por otra parte, la comparación de la estructura de los tres genes reveló la localización de un intrón, al parecer también conservado.

El sitio de iniciación de la transcripción en el gene de cutinasa de *C.capsici* no está asociado con la clásica caja TATAA que se encuentra en la mayoría de los genes eucarióticos. El gene de cutinasa de *F.solani* carece de ambas cajas consenso TATAA y CAAT y el gene de cutinasa de *C.gloeosporioides* también carece de la caja TATAA. Aunque los tres genes carecen de la caja



TATAA, ellos tienen una secuencia TAAATA en una localización común. En el gene de *C capsici* esta secuencia se ubica a 34 nucleótidos en dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción o 177 nucleótidos a partir del sitio de inicio de la traducción. En los genes de *C gloesporioides* y *F solani* la secuencia TAAATA se ubica a 160 y 111 nucleótidos de los sitios de inicio de la transcripción y la traducción respectivamente. Una secuencia CAAT precediendo a la secuencia TAAATA en *C capsici* por 30 nucleótidos y en *C gloesporioides* por 18 nucleótidos esta en una localización homologa para cajas CAAT en genes de eucariontes. Una secuencia similar CAAG se encontró en el gene de *F solani*, pero está a solo dos nucleótidos de la secuencia TAAATA. La secuencia CAGAC que constituye el centro de la secuencia TCCAGACCA, la cual esta asociada con el inicio de la transcripción en *C capsici* se encuentra duplicada a 21 nucleótidos de distancia en dirección 3' de los sitios de inicio. Esta región CAGAC también se encuentra duplicada a 11 nucleótidos de distancia dentro de los límites del nucleótido 66 en dirección 3' de la secuencia TAAATA en los genes de *C gloesporioides* y *F solani*.<sup>120</sup>

Se ha demostrado que solo el 43% de los residuos son conservados entre diferentes cutinasas,<sup>120</sup> por lo cual, las diferencias entre la cutinasa de *P. capsici* y el gene clonado podría considerarse como un hallazgo normal, no solamente porque se ha establecido que existen diferencias entre los genes de cutinasa de diferentes especies, si no porque el gene clonado pertenece a un microorganismo procarionte. De ahí que, estas diferencias pudieran significar tanto cambios antigénicos como funcionales característicos de este género bacteriano. Será importante concluir la secuencia del gene para llevar a cabo una evaluación todavía más precisa de todas las regiones del mismo.

Todas las serovariedades de la geno especie *biflexa* y algunas serovariedades de la geno especie *interrogans* producen lipasas, mientras que, serovariedades representantes de las geno especies *borgpetersenii*, *noguchii*, *santarosai* y *weillii*, se han reportado como no productoras de lipasas. Las lipasas de algunas cepas exhiben una especificidad posicional.<sup>5,121</sup>

Por otro lado, se ha determinado que las lipasas muestran selectividad hacia los eritrocitos de diferentes especies animales, lo cual depende a su vez, del tipo de fosfolípidos predominante en su membrana.<sup>122</sup>

En miembros del género *Leptospira*, han sido detectadas estearasas que actúan sobre ácidos grasos de 5, 6, 8, 9 y 10 átomos de carbono.<sup>123</sup>

Si bien las leptospiaras no muestran una afinidad directa hacia las plantas y la cutina presente en éstas, si la tienen hacia los ácidos grasos de cadena larga presentes en el suero sanguíneo y hacia los fosfolípidos presentes en la membrana de algunos tipos celulares como los eritrocitos y

las células del endotelio vascular. En todo caso, la participación de las lipasas es necesaria para la hidrólisis de este tipo de ácidos grasos.

Es significativo el hecho de haber aislado un gen que codifica para la síntesis de una enzima que pertenece al grupo de las lipasas, dado que, en este tipo de microorganismos, las lipasas tienen una participación importante, no solo para el metabolismo, sino también, en lo referente a la virulencia de las leptospiras. Será importante conocer si este gene codifica para una lipasa que participa en el metabolismo de esta serovariedad, si pudiera estar asociada a una actividad hemolítica o incluso resulta interesante determinar si tiene alguna relación con la adherencia a alguna superficie específica en las diferentes especies animales, tal como la cutinasa lo hace pero hacia las plantas.

Considerando que algunos genes que confieren atributos de virulencia en las bacterias, normalmente están flanqueados por SI, regiones de ADN dentro de las cuales a su vez está codificada la síntesis de transposasas, resulta significativo el hecho de haber encontrado en la misma dirección el gene de la transposasa y el gene que mostró homología con la cutinasa, el cual podría estar asociado con alguna propiedad de virulencia. Por lo anterior, será crítico realizar la caracterización funcional del gene, para confirmar o descartar esta posibilidad.

Las enzimas denominadas transposasas están codificadas en transposones los cuales son secuencias de ADN que pueden moverse aleatoriamente de un lugar a otro, en la misma cadena de ADN mediante la ayuda de las transposasas, las cuales cortan el ADN de la cadena blanco y el ADN en ambos extremos del transposón y posteriormente unen los dos extremos del transposón con los extremos del ADN blanco llevando a término la transposición.<sup>124</sup>

Diferentes investigadores han reportado el aislamiento de SI a partir de *L. borgpetersenii*, y se sugiere que estas SI pueden estar involucradas en rearrreglos cromosomales.<sup>68,70,73</sup> De igual forma, las diferencias encontradas en el número de copias en una misma serovariedad apoya la hipótesis acerca de que este tipo de secuencias son elementos transposables activos.<sup>72</sup>

Doak *et al.* reportaron una proteína codificada en la SI aislada, la cual mostró similaridad con un elemento del grupo de las SI y a la D<sub>35</sub>E de la superfamilia de transposasas.<sup>125</sup>

Considerando la importancia de este tipo de enzimas en los procesos de transposición, el aislamiento de un gen que codifica para la síntesis de una transposasa en la serovariedad *icterohaemorrhagiae* mantiene abierta la posibilidad de determinar si este gen forma parte de una SI no reportada y conocer que otros genes que están asociados con la misma. Así mismo, este resultado apoya la idea de la participación de este tipo de elementos en la heterogeneidad ya reportada en el género *Leptospira*.

En la dirección opuesta se encontró una homología con un gen que codifica para la  $\beta$ -lactamasa TEM-79 resistente a inhibidores presente en *Escherichia coli* con una identidad del 100% y una similitud del 100%.

Las  $\beta$ -lactamasas son la principal causa de resistencia bacteriana a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, por lo que han sido motivo de investigaciones extensas a nivel microbiológico, bioquímico y genético.<sup>126</sup> Su evolución en términos de actividad catalítica fue acelerada por el uso intensivo de  $\beta$ -lactámicos naturales y semisintéticos en áreas como la agricultura, la industria y la medicina.<sup>127</sup> Con base en sus características funcionales, sustrato sobre el cual actúan y el perfil de inhibición, las  $\beta$ -lactamasas han sido clasificadas de la siguiente forma: **grupo 1.** Cefalosporinasas que no son totalmente inhibidas por el ácido clavulánico; **grupo 2.** Penicilinasas, cefalosporinasas y  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro que generalmente son inhibidas por inhibidores de  $\beta$ -lactamasas sitio-dirigidos; **grupo 3.** Metalo- $\beta$ -lactamasas que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas y carbapenems. Este tipo de enzimas son poco inhibidas por la mayoría de las moléculas que contienen  $\beta$ -lactámicos; **grupo 4.**  $\beta$ -lactamasas que no son inhibidas por el ac. clavulánico.<sup>126</sup> Desde el punto de vista molecular, cuatro clases de  $\beta$ -lactamasas han sido descritas (A, B, C y D), dentro de las cuales se incluyen a más de 190  $\beta$ -lactamasas reportadas en diferentes especies bacterianas. Las clases A, C y D actúan sobre antibióticos que tienen sus sitios activos a la serina y la clase B comprende a aquellas que son dependientes del zinc (inhibidas por EDTA).<sup>128</sup> Si bien el descubrimiento de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas fue algo que solucionó en parte el problema de resistencia, las bacterias han desarrollado nuevos mecanismos de resistencia, los cuales han llegado a superar los efectos inhibitorios de los inactivadores de  $\beta$ -lactamasas. Esta resistencia representa un serio riesgo al evitar el efecto protector de inhibidores en contra de las penicilinas (sensibles a las  $\beta$ -lactamasas clásicas), que frecuentemente son utilizadas en el área médica.<sup>128</sup> Uno de los mecanismos de resistencia que recientemente se ha reportado es la sustitución de aminoácidos en la TEM-1  $\beta$ -lactamasa, lo cual da como resultado una baja afinidad de la enzima por los inhibidores.<sup>129</sup>

El hallazgo de un gen que codifica para una  $\beta$ -lactamasa en *L. icterohaemorrhagiae* resulta relevante al considerar que la resistencia a antibióticos es uno de los mecanismos de patogenicidad con que cuentan las bacterias para no ser inhibidas por antibióticos  $\beta$ -lactámicos. De igual forma, refuerza los resultados reportados por Spradbrow 1963 y Gilks 1988, quienes reportaron, en diferentes años, la resistencia a penicilina en la serovariedad *icterohaemorrhagiae*.<sup>94,95</sup> En aquel tiempo, los resultados obtenidos evidenciaban un fenotipo, el

de una cepa resistente al antibiótico. En este trabajo, los resultados obtenidos evidencian el genotipo de una cepa resistente a antibióticos del grupo de los  $\beta$ -lactámicos.

La aplicación de técnicas de biología molecular en combinación con ensayos biológicos, hace posible conocer la función de los genes, y, a través de la manipulación genética, producir proteínas recombinantes, para implementar herramientas diagnósticas e inclusive prevenir una enfermedad mediante la obtención de un biológico recombinante.

En las décadas pasadas, prácticamente la única bacteria que se estudiaba a nivel molecular era *E. coli*, bacteria para la cual, los sistemas de transferencia de material genético eran bien conocidos y estaban disponibles. La aplicación de estos conocimientos para estudiar bacterias diferentes permitió el mapeo de unos pocos genomas bacterianos, la identificación de algunos genes y algunos mecanismos de regulación genética. Sin embargo, las técnicas genéticas no estaban disponibles para la investigación de la mayoría de las bacterias patógenas.<sup>130</sup>

A partir del advenimiento de la tecnología del ADN recombinante, el surgimiento de las técnicas para la clonación de genes y los métodos que permiten una rápida secuenciación del ADN, se despertó el interés de los investigadores en todo el mundo, lo cual se ha visto reflejado con un aumento en el número de reportes acerca de los mecanismos moleculares de regulación de los determinantes de virulencia en muchas bacterias patógenas. Los conceptos de la biología molecular se han extendido a todas las ciencias de la vida, formando el eje central de las ciencias básicas. Las técnicas moleculares están ahora transformando a las ciencias médicas, desde la inmunología a las neurociencias y del diagnóstico médico a la investigación en cáncer.<sup>131,132,133</sup>

La colonización, secreción de sustancias tóxicas y en muchos casos, la evasión de la respuesta inmune, promueven la aparición de cambios patológicos en diferentes tejidos de un huésped, dando lugar a la aparición de diversas manifestaciones clínicas que se pueden evidenciar visualmente y a su vez categorizar dependiendo de la severidad del daño causado sin conocer su origen. Lo anterior, hace referencia a las propiedades fenotípicas de las leptospiras (virulencia), las cuales dependen directamente de las propiedades genotípicas (patogenicidad). Dicho de otra forma, "para poder entender el fenotipo de las leptospiras, es necesario conocer su genotipo"<sup>2</sup>

Por el momento se han descrito aproximadamente 50 genes del genoma de *Leptospira*, lo cual confirma lo limitado que han sido las investigaciones en esta área. Los genes en su conjunto conforman el genoma de las leptospiras, en el cual se codifica no solo la síntesis de las diferentes estructuras bacterianas, sino también están codificadas propiedades como la adhesión, la resistencia a antibióticos (que también está codificada en plásmidos), la producción de hemolisinas, enzimas extracelulares, oligosacáridos antigénicos y lípidos tóxicos. Cada vez es

más evidente la importancia de llevar a cabo estudios de biología molecular sobre el genoma de las diferentes genoespecies patógenas de *Leptospira* que permitan caracterizar a los diferentes genes que participan tanto en la biosíntesis de componentes estructurales y metabólicos como aquellos que participan en el proceso de infección. Muchas de las respuestas que se buscan constantemente en relación a la leptospirosis se encuentran en el genoma de las leptospirosis y se irán respondiendo conforme se realicen investigaciones directas sobre los genes que conforman este genoma.

Durante décadas, en diferentes países dentro de los que se incluye México, la detección indirecta de la bacteria se ha llevado a cabo, utilizando la prueba de **AM**, la cual definitivamente es considerada la principal herramienta con la que se cuenta en la actualidad para poner de manifiesto la exposición de un animal o ser humano a leptospirosis patógenas. El diagnóstico serológico, ha permitido conocer la frecuencia y en algunos casos la prevalencia de las diferentes serovariedades en diversas especies de animales domésticos, silvestres y el hombre, en más de la mitad de los países del mundo.<sup>7</sup> Sin embargo, para establecer el diagnóstico definitivo de la enfermedad, la detección directa del agente etiológico es fundamental.

En el caso de las leptospirosis, el aislamiento a partir de muestras clínicas (orina, sangre o tejidos) es difícil, requiere de un periodo de tiempo considerable (4 a 6 semanas) y que las bacterias estén viables, ya que leptospirosis muertas en una muestra clínica no pueden ser detectadas por esta vía. Ante esta realidad, cada vez se hace más necesaria la implementación de diferentes técnicas moleculares para la detección directa de leptospirosis en una muestra clínica, ya que este tipo de herramientas permite detectar directamente ADN de leptospirosis vivas o muertas en menos tiempo y con una alta sensibilidad y especificidad.

Con la finalidad de aislar genes de *Leptospira icterohaemorrhagiae* cepa RGA para su posterior secuenciación, se construyó un banco genómico de expresión en el vector  $\lambda$  ZAP-EXPRESS. El antisuero policlonal producido alcanzó un título de 1:25,600. Considerando que el título mínimo recomendado para un antisuero contra *Leptospira* es de 1:12,800,<sup>18,101</sup> el antisuero policlonal contra *L. icterohaemorrhagiae* se consideró adecuado para su uso en los escrutinios del banco genómico de expresión. Los escrutinios realizados con anticuerpos policlonales permitieron la recuperación de clonas recombinantes, las cuales a su vez fueron sometidas a un procedimiento de purificación para su posterior secuenciación y análisis de la secuencia. Los resultados muestran que la detección inmunológica puede considerarse como una estrategia adecuada para la detección de genes que codifican para la síntesis de proteínas de *L. icterohaemorrhagiae*. El análisis de las secuencias permitió conocer el tipo de genes aislados, con base en la homología observada con secuencias registradas en el banco de genes. Será importante realizar ensayos

de mutagénesis dirigida en combinación con ensayos en sistemas biológicos para comprobar o en su caso conocer la función de los genes aislados. De igual forma, es necesario continuar con la secuenciación completa de este fragmento para conocer que otro tipo de genes fueron clonados y realizar la caracterización de los mismos. De esta manera, se aportará nueva información referente al genoma de las leptospiras.

Por otro lado, considerando que el diagnóstico de laboratorio es una de las prioridades en la leptospirosis, la evaluación posterior de los genes aislados mediante el diseño de iniciadores en experimentos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), así como en reacciones de hibridación, determinará si es posible iniciar una línea de investigación con la finalidad de implementar dichas técnicas, para realizar la detección directa de las leptospiras a partir de muestras clínicas.

Para determinar si el gene que mostró homología con una lipasa tiene alguna relación con virulencia. Será necesario determinar que serovariedades presentan el gene. Si únicamente leptospiras patógenas presentaran el gene, podría tratarse de un gene relacionado con virulencia, pero, si tanto leptospiras patógenas como no patógenas lo presentaran, podría tratarse de una lipasa con actividades metabólicas. En ambos casos el hallazgo resulta relevante, ya que a diferencia de la mayoría de las bacterias, éste género bacteriano utiliza ácidos grasos de cadena larga como fuente de energía y las lipasas son fundamentales para la hidrólisis de este tipo de compuestos. Así mismo, hemolisinas como la fosfolipasa y la esfingomielinasa son importantes mecanismos de patogenicidad, responsables de algunos de los signos y lesiones que caracterizan a la leptospirosis.

Mediante un ensayo de hibridación utilizando al gene aislado como sonda se podría determinar si el gene está presente únicamente en serovariedades patógenas o si también se encuentra en serovariedades no patógenas, lo cual es importante conocer para determinar su función. De igual forma, serían necesarios ensayos en sistemas biológicos (hámsters o cultivo celular) con cepas que presenten el gene y cepas que no lo presenten para determinar si existe alguna diferencia. Posterior a este ensayo, podría realizarse un ensayo de complementación entre una serovariedad que presenta el gene y una que no lo presente, para ver si después de la complementación la serovariedad que recibió el gene muestra diferencias en el ensayo biológico. El hecho de encontrar diferencias y cambios patológicos después de haber adquirido el gene, demostraría que existe una relación con virulencia.

Otra estrategia sería realizar una mutagénesis dirigida en el gene y determinar el efecto resultante, para después compararlo con el comportamiento observado en la cepa original.

Por otro lado, es necesario realizar ensayos en medios de cultivo con diferentes concentraciones de penicilina para demostrar que existe una relación entre el gene de  $\beta$ -lactamasa encontrado en la serovariedad *icterohaemorrhagiae* y la resistencia *in vitro* al antibiótico.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## CONCLUSIONES.

El uso del vector de clonación  $\lambda$  ZAP EXPRESS mostró ser una opción adecuada para la clonación y posterior secuenciación de fragmentos genómicos de *L.interrogans* serovariedad *icterohaemorrhagiae*.

Con base en los resultados obtenidos, se establece que la detección inmunológica puede considerarse como una estrategia adecuada para el aislamiento de genes que codifican para la síntesis de proteínas inmunogénicas de *L. icterohaemorrhagiae*.

En el presente trabajo se clonaron y secuenciaron los genes que codifican para síntesis de una lipasa, una transposasa y una  $\beta$ -lactamasa, presentes en la serovariedad *icterohaemorrhagiae*.

El aislamiento de un gene de *L. icterohaemorrhagiae* que mostró homología con una lipasa, resulta trascendente si se considera que en éste tipo de microorganismos, las lipasas participan tanto en procesos metabólicos, como formando parte de los mecanismos de patogenicidad.

La caracterización funcional de éste gene aportará información relevante para estudios futuros con esta serovariedad, la cual tiene una amplia distribución en diferentes especies animales y en el ser humano.



## LITERATURA CITADA.

1. Songer JG, Thiermann AB. Leptospirosis. J Am Vet Assoc 1988 193:1250-1254.
2. Faine S. *Leptospira* and Leptospirosis CRC Press, Inc. 1994.
3. Godínez RC, Zelaya RB, Aureoles GD, Verdugo RA, Rodríguez REA, De la Peña MA. Antibodies against *Leptospira interrogans* in California Sea Lion Pups from Gulf of California. J Wilif Dis 1999, 35:108-111.
4. Krieg RN, Holt GJ. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1 Williams & Wilkins Baltimore/London 1984.
5. Yasuda PA, Steigerwalt AG, Sulzer KR, Kaufman AF, Rogers F, Brenner DJ. Desoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. Int J Syst Bacteriol 1987, 37:407-415.
6. Ramadass P, Jarvis BWD, Corner RJ, Penny D, Marshall RB. Genetics characterizations of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. Int J Syst Bacteriol 1992, 42:215-219.
7. Abdussalem M. Situación mundial del problema de la leptospirosis. VIII Reunión Interamericana sobre el Control de la Fiebre Aftosa y otras Zoonosis; 1975 abril 16 al 19; Guatemala.
8. Gavaldón RDG. Leptospirosis en humanos. Memorias del Primer Seminario-Taller Nacional sobre el Diagnóstico y Control de la Leptospirosis; 1997 julio 23 al 25; México DF, Universidad Autónoma Metropolitana.
9. Saiz SC. Contribución al estudio de la incidencia de la leptospirosis en el ganado bovino. (tesis de licenciatura) México, D. F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1962.
10. Varela J. Serología de leptospirosis en la República Mexicana, Revista de Investigación en Salud Pública, S. S. A. 1972, vol. 32 No. 1 Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales, México.
11. Palacios AJM, Vázquez MJ, Sánchez SMR, León LL. Aislamiento de *Leptospira spp.*, determinación de niveles de anticuerpos específicos y estudio histopatológico de riñones de perros del D. F. (tesis de Licenciatura) México, D. F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1983.
12. Zamora BJ, Riedmann GS, Montecinos MY, Cabezas XO. Encuesta serológica de

- leptospirosis humana en ocupaciones de alto riesgo en Chile. Rev Med Chil 1990, 118:247-232.
13. Caballero SA, Pérez SJC, Colin OJR, Bernal VC, Alarcón VJA, Lomelin ZRR, Cuellar EA J. Seropositividad a leptospiras en trabajadores del rastro de la ciudad de Guadalajara, Jal. Mex. en 1995. Enfermedades Infecciosas y Microbiología. 1996, Vol.16 No. 5.
  14. García SR, Camarena VG, González NDE. Estudio de la leptospirosis humana en la República Mexicana. Enfermedades Infecciosas y Microbiología. 1998 vol.18 ISSN – 1405-0994.
  15. García SR, Camarena VG, González NDE. Anticuerpos contra leptospiras en casos de Dengue hemorrágico positivos clínicamente y negativos por el laboratorio. Enfermedades Infecciosas y Microbiología. 1998 vol.18 ISSN - 1405-0994.
  16. Evans AF, Brackman PS. Bacterial infections of humans. Epidemiology and control, 2<sup>nd</sup> ed Eds. Plenum Medical, New York, 367-393 1991.
  17. Carter ME, Cordes DO. Leptospirosis and other infections of *Rattus rattus* and *Rattus norvegicus*. New Zeland Vet J 1980, 28: 45-50.
  18. Myers DM. Manual de Métodos para el Diagnóstico de Laboratorio de Leptospirosis. Centro Panamericano de Zoonosis. Buenos Aires, Argentina: Organización Mundial de la Salud. 1985.
  19. Torres BJI. La leptospirosis bovina. Memorias del Primer Seminario-Taller Nacional sobre el diagnóstico y control de la leptospirosis; 1997 julio 23 al 25; México (DF) Universidad Autónoma Metropolitana.
  20. Baldwin CJ, Atkins CE. Leptospirosis in dogs. Comp S Anim 1987, 9:5 499- 507.
  21. Sánchez MP. La leptospirosis canina en México, serovariedades predominantes. (tesis de licenciatura) México, D. F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1992.
  22. Luna AMA. Frecuencia serológica de leptospirosis canina en el municipio de Naucalpan de Juárez estado de México. (tesis de licenciatura) México, D. F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1993.
  23. Luna AMA, Moles CLP, Urrutia VRM, Nava VC. Aspectos clínicos reportados en leptospirosis canina. Memorias del Primer Seminario-Taller Nacional sobre el diagnóstico y control de la leptospirosis; 1997 julio 23 al 25; México (DF) Universidad Autónoma Metropolitana.
  24. Rodríguez REA, Suárez GF. Análisis retrospectivo de los casos de leptospirosis en perros remitidos al laboratorio de bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia -

- U. N. A. M. en el periodo de enero de 1993 a junio de 1994. Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias; 1994 octubre 9-15;. Acapulco (Guerrero) México; Asociación Panamericana de Ciencias Veterinarias, 1995:115.
25. Hernandez GE, Rodríguez REA, Jiménez F, De la Peña MA. Perfil del serodiagnóstico de leptospirosis en bovinos de 1990 a 1996. Memorias del XXI Congreso Nacional de Buiatría; 1997 julio 9-12; Colima (Colima) México. México (D. F.): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 1997:53.
  26. Bolin CA, Zurner RL, Trueba G. Comparison of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* typto *hardjo-bovis* in bovine urine. *Am J Vet Res* 1989, 50:1001-1003.
  27. Faine S, Hoeden VJ. Virulence-Linked colonial and morfological variation in *Leptospira*. *J Bacteriol* 1964, 88:1493-1496.
  28. Hanson LE. Leptospirosis in domestic animal: The public helt prospective. *J Am Vet Med Assoc* 1982, 119:1506.
  29. Birch AA, Hovind HK, Borg PG. Electron microscopy of *Leptospira* 1. *Leptospira* strain *pomona*. *Pathol Microbiol Scand* 1973, 81:665-676.
  30. Bromely BD, Charon NW. Axial filament involvement in the motility of *Leptospira interrogans*. *J Bacteriol* 1979, 137: 1406-1412.
  31. Mitchison M, VinhT. Cloning and analysis of the rhamnose biosynthesis genes of the *rfb* locus involved in LPS biosynthesis in *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*. Abstracts of the VIII<sup>th</sup> Meeting of European *Leptospira* Workers, Anzio, Rome, Italy, july 11-13 1994.
  32. Jost BH, Adler B, Faine S. Reaction of monoclonal antybodies with specie-specific determinants in *Leptospira interrogans* outer envelope. *J Med Microbiol* 1988, 27:51-57.
  33. Midwinter A, Vinh T. Characterization of an antigenic oligosacharide from *Leptospira interrogans* serovar *pomona* and its role in immunity. *Infect Immun* 1994, 62:5477-5482.
  34. Takimoto T, Ono E, Ito T, Yanagawa R. Affinity constants of antileptospira monoclonal antybodies, numbers of antigenic determinants on leptospiras, and their influence on the microscopic agglutination test and ELISA. *Microbiol Immunol* 1988, 32:775-778.
  35. Sakamoto N, Ono E, Kida H, Yanagawa R. Characterización of partially purified leptospiral Genus-specific protein antigen. *Zentrlabl Bakteriol Microbiol Hyg Abt I Orig Reihe A* 1985, 259:507-519.
  36. Ballard SA, Segers RPAM, Bleumink PN, Fyfe J, Faine S, Adler B. Molecular analysis of the *hsp* (*groE*) operon of *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*. *Molec Microbiol* 1993, 8:739-751.

37. Haake DA, Champion CI, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding Omp11, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira spp.* J Bacteriol 1993, 175:4225-4234.
38. Vinh T, Faine S, Adler B. Adhesion of leptospires to mouse fibroblasts (L-929) and its enhancement by specific antibody. J Med Microbiol 1994, 18:75-85.
39. Thomas DD, Higbie LM. *In vitro* association of leptospires with host cells. Infect Immun 1990, 58: 581-585.
40. Marshall RB. Ultrastructural changes in renal tubules of sheep following experimental infections with *L. interrogans* serotype pomona. J Med Microbiol 1974, 7:505-508.
41. Kefford B, Kjellenberg S, Marshall KC. Bacterial scavenging: utilization of fatty acids localized at a solid-liquid interface. Arch Microbiol 1983, 133:257-260.
42. Kefford B, Marshall KC. Adhesion of leptospira at a solid-liquid interface: a model. Arch Microbiol 1984, 138:84-88.
43. Alexander A, Baer A, Fair JR, Gochenour WS, King H, Yager RH. Leptospiral uveitis report of a bacteriologically verified case. Arc Ophthalmol 1951, 48:292-297.
44. Faine S. Factors affecting the development of the carrier state in leptospirosis. J Hyg 1962, 60:427-434.
45. Ito T, Takimoto T, Yanagawa Y. Presence of a variety of antigenic variants belonging to at least 4 different serovars in a population of *Leptospira interrogans* serovar hebdomadis. Zentralbl Bakteriolog Hyg A 1988, 269:15-25.
46. Merien F, Perolat P, Mercel E, Persan D, Baranton G. Detection of leptospira DNA by Polymerase Chain Reaction in aqueous humor from a patient with unilateral uveitis. J Infect Dis 1993, 168:1335-1336.
47. Merien F, Baranton G, Perolat P. Invasion of vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. Infect Immun 1997, 729-738.
48. Vinh T, Adler B, Faine S. Glycoprotein cytotoxin from *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. J Gen Microbiol 1986, 132:111-123.
49. Santos RT, Sakata EE, Yasuda PH, Wakamatu A, Kanamura CT, *et al.* Glycoproteins from *Leptospira interrogans* serogroupo *icterohaemorrhagiae* :immunohistochemical expression in the liver and kidney of experimentally infected guinea pigs. Rev Med Trop Sao Paulo 1989, 31:235-241.
50. Arimitsu Y, Moribayashi A, Goto N. Skin reactions to lipids from avirulent strain Shibaura of *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. Canad J Microbiol 1989, 35:1009-1014.

51. hompson JC, Manktelow BW. Pathogenesis of renal lesions in haemoglobinemic and non haemoglobinemic leptospirosis. *J Comp Pathol* 1989, 101:201-214.
52. Bazovska S. Sphingomyelinase activity of leptospira cultures. *Czech Epidem Microbiol Immunol* 1978, 27:137-143.
53. Segers PAM, Drift VA, Corcione PN, Bernard AM, Gaastra W. Molecular analysis of sphingomyelinase C gene from *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *Infect Immun* 1990, 58:2177-2185.
54. Tu V, Adler B, Faine S. Glycoprotein toxic from *L. interrogans* serovar *copenhageni*. *J Gen Microbiol* 1986, 135:2663-2673.
55. Shimizu T, Matsusuka E, Takayanagi T, Masuzawa T, Iwamoto Y, *et al.* Biological activities of lipopolysaccharide-like substance (LLS) extracted from *Leptospira interrogans* serovar *canicola* strain Moulton. *Microbiol Immunol* 1987, 31:727-735.
56. Van den Ingh TS, Hartman EG. Pathology of acute *Leptospira interrogans* serotype *icterohaemorrhagiae* infection in the Syrian hamsters. *Vet Microbiol* 1986, 12:367-376.
57. Parma AE, Cerone SI, Sansinanea, SA. Biochemical analysis by SDS-PAGE and western blotting of the antigenic relationship between *Leptospira* and equine ocular tissues. *Vet Immunol Immunopathol* 1992, 33:179-185.
58. Davenport A, Rugman FP, Desmond MJ, Ganta R. Is thrombocytopenia seen in patients with leptospirosis immunologically mediated? *J Clin Pathol* 1989, 42:439-440.
59. Yuri K, Takamoto Y, Okada M, Hiramune T, Kikuchi N, *et al.* Chemotaxis of leptospire to hemoglobin in relation to virulence. *Infect Immun* 1993, 61:2270-2272.
60. Kikuchi N, Hiramune T, Takahasi T, Yanagawa R. Detection of leptospiral plasmid and comparison of plasmid profiles between virulent and avirulent leptospire. *J Vet Med Sci* 1996, 58:915-916.
61. Falkow S. The evolution of pathogenicity in *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. In: Neidhardt FC, editor. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. Washington, DC: American Society for Microbiology press 1996: 2723-2729.
62. Lee CA. Pathogenicity islands and the evolutions of bacterial pathogens. *Infect Agents Dis* 1996, 5: 1-7.
63. Hensel M, Shea JE, Baumler AJ, Gleeson C, Blantner F, Holden DW. Analysis of the boundaries of *Salmonella* pathogenicity island 2 and the corresponding chromosomal region of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 1997, 179:1105-1111.
64. Hacker J, Blum G, Muhldorfer I, Tschape H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* 1997, 23: 1089-1097.

65. Galas DJ, Chandler M. Bacterial insertion sequences. In: Berg DE, Howel M.M. editor. Mobile DNA. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 1990: 109-162.
66. Pacciarini ML, Savio JL, Taglibu S, Rossi C. Repetitive sequences cloned from *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* genotype *hardjoprajitno* and their application to serovar identification. J Clin Microbiol 1992, 30: 1243-1249.
67. Staint GI, Norris SJ, Gobel U, Meyer J, Walker EM, Zuerner RL. Genome structure of spirochetes. Res Microbiol 1992, 143: 615-621.
68. Woodward MJ, Sullivan GJ. Nucleotide sequence of a repetitive element isolated from *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type *hardjobovis*. J Gen Microbiol 1991, 137: 1101-1109.
69. Zuerner RL, Ellis WA, Bolin CA, Montgomery JM. Restriction fragment length polymorphism distinguish *Leptospira borgpetersdenii* serovar *hardjo* type *hardjobovis* isolated from different geographical locations. J Clin Microbiol 1993a, 31: 578-583.
70. Zuerner RL. Nucleotide sequence analysis of IS1533 from *Leptospira borgpetersenii* identification and expression of two IS encoded proteins. Plasmid 1994, 37: 1-11.
71. Zuerner RL, Herrman JL, Staint GI. Comparison of genetics maps for two *Leptospira interrogans* serovars provides evidence for two chromosomes and intraespecies heterogeneity. J Bacteriol 1993b, 175:5445-5451.
72. Eude B, Staint GCI, Zuerner RL. Characterization of IS1500, an IS3-like element isolated from *Leptospira interrogans*. Microbiol 1995, 141: 2165-2173.
73. Zuerner RL, Bolin CA. Repetitive sequence element cloned from *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type *hardjobovis* provides a sensitive diagnostic probe for bovine leptospirosis. J Clin Microbiol 1988, 26: 2495-2500.
74. Zurner RL, Bolin CA. Nucleic acids probe characterizes *L. interrogans* serovars by restriction fragment length polymorphism. Vet Microbiol 1990, 24:355-356.
75. Zuerner RL, Bolin CA. Differentiation of *Leptospira interrogans* isolates by IS1500 hybridization and PCR assay. J Clin Microbiol 1997, 35:2612-2617.
76. Harmann JL, Baril C, Bellenger E, Perolat P, Baranton G, Staint GI. Genome conservation in isolates of *Leptospira interrogans*. J. Bacteriol 1991, 173:7582-7588.
77. Herrmann JL, Bellenger E, Perolat P, Baranton G, Staint GI. Pulsed field gel electrophoresis of NotI digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. Clin Microbiol 1992, 30:1696-1702.
78. Aber MD, Robert C, Donald C, Mackel MS. Epidemiologic typing of nocosomial microorganisms. Am Jour Med 1981, 70: 899 - 905.

79. Eisenstein IB. New molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases. *Jour Infect Dis* 1990,161:595-602.
80. Selander RK, Caugant DA and Whittmann TS. In *Escherichia coli* an *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Neidhardt FC. (Ed. In chief) ASM pp. 1625-1628 1987.
81. Meinkoth J, Wahl G. Hybridization of nucleic acid immobilized on solid supports. *Anal Biochem* 1984, 138:267-284.
82. Wose CR. In *Evolution in Prokariotes*. Schleifer KH. And Stackerbrandt ed. Academic press, London 1986 pag 20-36.
83. Amann IR, Krumholz L, Stahl AD. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol* 1990, 172: 762-770.
84. McCabe PC. *PCR Protocols: a Guide to methods and Applications*. 1990, Academic press, 76-83.
85. Gerritsen MJ, OlyhoekT, Smits AM, Bokhout AB. Sample preparation method for polymerase chain reaction-based semiquantitative detection of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* subtype *hardjobovis* in bovine urine. *J Clin Microbiol* 1991, 29:2805-2808.
86. Welsh J, McClelland M, Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 1990, 18:7213-7218.
87. LeFebvre RB. DNA probe for detection of the *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* genotype *hardjobovis*. *J Clin Microbiol* 1987, 25:2236-2238.
88. LeFebvre RB, Foley JW, Thiermann AB. Rapid and simplified protocol for isolation and characterization of leptospiral chromosomal DNA for taxonomy and diagnosis. *J Clin Microbiol* 1985, 22:606-608.
89. LeFebvre RB, Thiermann AB. DNA homology studies of leptospires of serogroups Sejroe and Pomona from cattle and swine. *Am J Vet Res* 1986, 47: 959-963.
90. McCormick BM, Millar BD, Monckton RP, Jones RT. Detection of leptospires in pig kidney using DNA hybridization. *Res Vet Sci* 1989, 47:134-135.
91. Millar BD, Chappel RJ, Adler B. Detection of leptospires in biological fluids using DNA hybridization. *Vet Microbiol* 1987, 15:71-78.
92. Ramadass P, Marshall RB. Species differentiation of *L. interrogans* serovar *hardjo* strain *hardjobovis* from strain *hardjoprajitno* by DNA slot blot hybridization. *Res Vet Sci* 1990, 49:194-197.
93. Thiermann, AB, Handsaker, AL, Moseley, SL, Kinscote, B. New method for classification of

- leptospiral isolates belonging to serogroup Pomona by restriction endonuclease analysis: serovar *kennewicki*. *J Clin Microbiol* 1985, 21:585-587.
94. Prescott FJ, Baggot DJ. Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 2<sup>nd</sup> ed Iowa State University press / Ames, 1993.
  95. Spradbrow PB. Sensitivity to drugs of Australian leptospiral serotypes. *Brit J Pharmacol* 1963, 20: 230-236.
  96. Gilks CF, Lambert HF, Broughton ES, Baker CC. Failure of penicillin prophylaxis in laboratory acquire leptospirosis. *Postgrad Med J* 1988, 64: 236-238.
  97. McClain JBL, Ballou WR, Harrison SM, Steinweg DL. Doxycycline therapy for leptospirosis. *Ann Internal Med* 1984, 100:696-698.
  98. Cisneros PMA. Tratamiento prevención y control de la leptospirosis porcina. Memorias del Primer Seminario-Taller Nacional sobre el diagnóstico y control de la leptospirosis; 1997 julio 23 al 25; México (DF) Universidad Autónoma Metropolitana.
  99. Ellinghausen HC, McCullough WG. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 others serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Amer J Vet Res* 1965, 26:45-51.
  100. Johnson RC, Harris VG. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire. Growth at low temperatures. *J Bacteriol* 1967, 94:27-31.
  101. Baranton DPG. Methodes de Laboratoire Leptospire - Borreliose de Lyme. Commission des Laboratoires de Référence et d' Expertise de l'Institut Pasteur, 1989.
  102. Graber A, Zingales B. Alternative method to remove antibacterial antibodies from antisera used for screening of expression libraries. *Biotechniques* 1985, 19:28-30.
  103. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring harbor New York 1989 pp 56-67.
  104. Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res* 1997, 25:3389-3402.
  105. Clarke L, Carbon J. A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* 1977, 9:91-95.
  106. Sebastian J, Chandra AK, Kolattukudy PE. Discovery of cutinase-producing *Pseudomonas* sp. cohabiting with an apparently nitrogen fixing *Corynebacterium* sp. in the phyllosphere. *J Bacteriol* 1987, 169: 131-136.
  107. Schäfer W. The role of cutinase in fungal pathogenicity. *Trends Microbiol* 1993, 1:69-71.



108. Kolattukudy PE In: Borgetröm B, Brockman H. Eds. Cutinases from fungi and pollen. Elsevier, Amsterdam 1984, 471-504.
109. Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J, Sussman JL, Verschueren KHG, Goldman A. The  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold. *Protein Eng* 1992, 5: 197-211.
110. Martínez C, Nicolas A Tilbeurgh H, Egiöff MP, Cudrey C, Verger R, Cambillau C. Cutinase, a lipolytic enzyme with a preformed oxyanion hole. *Biochem* 1994, 33:83-89.
111. Verger R. Haas GH, Interfacial enzyme kinetics of lipolysis. *Annu Rev Biophys Bioeng* 1976, 5:77-117.
112. Manesse MLM, Cox RC, Koops BC, Verhgeij HM, Haas GH. Cutinase from *Fusarium solani* pisi hydrolyzing triglyceride analogues. Effect of acylchain length and position in the substrate molecule on activity and enantioselectivity. *Biochem* 1995, 34: 6400-6407.
113. Dickman MB, Patil SS, Kolattukudy PE. Effects of organophosphorous pesticides on cutinase activity and infection of papayas by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiol Biochem* 1983, 73:1209-1214.
114. Maiti IB, Kolattukudy PE. Prevention of fungal infection of plants by specific inhibition of cutinase. *Science* 1979, 205:507-508.
115. Koller W Allan CR, Kolattukudy PE. Inhibition of cutinase and prevention of fungal penetration into plants by benomyl a possible protective mode of action. *Pestic Biochem Physiol* 1982, 18:15-25.
116. Dickman MB, Podila GK, Kolattukudy PE. Insertion of cutinase gene into a wound pathogen enables it to infect intact host. *Nature* 1989, 342:446-448.
117. Dantzig HA, Zuckerman HS, Andonov-Roland MM. Isolation of a *Fusarium solani* mutant reduced in cutinase activity and virulence. *J Bacteriol* 1986, 168: 911-916.
118. Longhi S, Cambiallau C. Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. *Biochem Biophys Act* 1999, 1441:185-196.
119. Lehninger LA. Principles of biochemistry. 1<sup>th</sup> ed. Worth Publisher, INC., New York, 1982.97-130.
120. Ettinger et al. (Ettinger WF, Thukral SK, Kolattkudy PE. Structure of cutinase gene, cDNA, and derived amino acid sequence from phytopathogenic fungi. *Biochem* 1987, 26:7883-7892).
121. Chorvath B, Benzonana G. The positional specificity of leptospiral lipases. *J hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1971, 15:123-125.
122. Casarov LB. Degradation of the erythrocyte phospholipids and hemolysis of the erythrocytes

- of different animal species by *Leptospira*. *J Med Microbiol* 1970, 3: 29-37.
123. Saito T, Ono E, Yanagawa R. Enzyme activities of the strains belonging to family *Leptospiraceae* detected by the API ZYM system. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg Series A* 1987, 266: 218-225.
  124. Snyder L, Champness W. *Molecular genetics of bacteria*. Washington, DC: American Society for Microbiology press, Washington D.C., 1997.
  125. Doak TG, Doerder FP, Jahn CL, Herrick G. A proposed superfamily of transposase genes: transposon like elements in ciliated protozoa and a common D<sub>35</sub>E motif. *Proc Natl Acad Sci* 1994, 91: 942-946.
  126. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995, 39: 1211-1233.
  127. Medeiros AA. Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generations of  $\beta$ -lactams antibiotics. *Rev Infect Dis* 1997, 24:519-545.
  128. Therrien C, Levesque RC. Molecular basis of antibiotic resistance and  $\beta$ -lactamase inhibition by mechanism-based inactivators: perspectives and future directions. *FEMS Microbiol* 2000, 24:251-262.
  129. Belaouaj A, Lapoumeroulie C, Caniaa MM, Vedel G, Nevot P, Krishnamoorthy R, Paul G. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like  $\beta$ -lactamases IRT-1 and IRT-2 (formally called TRI-1 and TRI-2). *FEMS Microbiol* 1994, 120: 75-80.
  130. Iglewski HB, Clark LV. *Molecular basis of bacterial pathogenesis*. Academic Press INC. San Diego California 1990:3-8.
  131. Setlow JK, Hollaender A. *Genetic engineering. Principles and methods*. New York, Plenum press, 1981:115-145.
  132. Watson JD, Tooze J, Kurtz DT. *Recombinant DNA. A short course*. New York. Scientific American Books, 1983:256-259.
  133. Boyer HW, Betlach M, Bolivar F, Rodríguez RL, Heineker HL, Shine Goodman HN. Impact of science and society. In: Beers RF, Basset FG. Eds. *Recombinant molecules*. New York, Raven press, 1979:223-230.