



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y SALUD ANIMAL**

**ANÁLISIS *in silico* DE LOS GENES *gspD_L* Y *gspE_L*
DEL SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO-II
DE *Leptospira biflexa* SEROVARIEDAD Patoc.**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

RODRIGO MENA BAÑUELOS

TUTOR: DR. ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA

COMITÉ TUTORAL:

DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ

DR. JORGE I. TORRES BARRANCA

MÉXICO, DF

2006



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 mis padres Susana, Nuria y Manuel por el gran cariño y apoyo que siempre he recibido,
además de su incansable interés.*

*A todos los que me han apoyado a lo largo de la vida y, en especial, a todos los que me han
enseñado y ayudado a desarrollarme en las ciencias veterinarias.*

Rodrigo

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por darme la oportunidad de realizar mis estudios de licenciatura y posgrado, además de los apoyos recibidos. También al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y Salud Animal.

Al Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma por compartir sus conocimientos de microbiología, en especial sobre las leptospiras. También por su amistad y el gran apoyo que recibí en estos últimos años.

A los doctores Antonio Verdugo Rodríguez y Jorge I. Torres Barranca por los valiosos comentarios en las tutorías y el desarrollo del proyecto.

Al Prof. Ben Adler y al Dr. Dieter M. Bulach de la Universidad de Monash, Clayton, Victoria, Australia, por el acceso al genoma de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjobovis.

Al Prof. David A. Haake de la Universidad de California EUA (UCLA) por la donación de la cepa de *L. biflexa* serovariedad Patoc cepa Patoc I.

A los doctores miembros del jurado Enrique Corona Barrera y Lemuel León Lara por sus importantes comentarios en el desarrollo de la tesis.

A la Unidad de Secuenciación y Biosíntesis de Oligonucleótidos del IBT-UNAM en Cuernavaca, Morelos.

A Felicitas y Amanda por el apoyo con el equipo del Laboratorio de Genética Molecular a cargo del Dr. Rogelio A. Morales.

A mis compañeros de generación de maestría por permitirme representarlos en el Comité Académico del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y Salud Animal FMVZ-UNAM y en el Colegio Académico para la Reforma del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UNAM.

A mis compañeros de laboratorio Armando, J. Alejandro, Carlos, Diana, Erika M, José Manuel, Luz Olivia, Raquel y Tania por su amistad y apoyo en estos años.

A todos los profesores del Departamento de Microbiología e Inmunología por sus consejos.

Agradezco especialmente a la doctora Ma. Cristina Rodríguez Sánchez por su valiosa orientación en el servicio social de licenciatura, ya que a través de su experiencia pude conocer y trabajar directamente con el diagnóstico en bacterias, hongos y leptospiras.

A E. Armando Rodríguez Reyes, Rigoberto Hernández Castro y Daniel Martínez Gómez por su apoyo en momentos críticos, además de sus consejos y amistad.

A mis amigas Andira, Cnidia, Isabel, Lorena, Lupita, Martha, Rosi y Verónica por su gran amistad. A Andrea por su amistad y apoyo en la redacción, además de varios consejos útiles.

A mis amigos de la comunidad del Jueves del Amigo por su grande y valiosa amistad: sin ustedes no sería lo mismo.

ÍNDICE

1 RESUMEN	1
2 INTRODUCCIÓN	3
2.1 Leptospirosis	3
2.2 Etiología	4
2.3 Clasificación Taxonómica	4
2.4 Características generales del género <i>Leptospira</i>	6
2.5 Consideraciones biológicas para el cultivo <i>in vitro</i> de <i>Leptospira</i>	9
2.6 Antígenos estructurales de <i>Leptospira</i>	11
2.6.1 Lipopolisacárido (LPS)	11
2.6.2 <i>Locus rfb</i> , genes para la biosíntesis del LPS	12
2.6.3 Proteínas de membrana externa (PME)	15
2.7 Mecanismos de patogenicidad y virulencia	21
2.8 Inmunidad	24
2.9 Leptospirosis	26
2.9.1 Manifestaciones clínicas	26
2.9.2 Epidemiología	28
2.9.3 Control y tratamiento	29
2.9.4 Diagnóstico de laboratorio	29
2.10 Genoma de <i>Leptospira</i>	30
2.11 Bacteriófagos y herramientas moleculares	33
2.12 Sistema de secreción tipo II (SST-II)	34
3 HIPÓTESIS	38
4 OBJETIVO GENERAL	38
5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
6 MATERIAL Y MÉTODOS	39
6.1 Cultivo de <i>Leptospira</i>	39
6.2 Extracción de ADN genómico	39
6.3 Purificación de ADN	40
6.4 Amplificación de genes del <i>loci gsp</i> en <i>L. biflexa</i> serovariedad Patoc	41
6.5 Síntesis de iniciadores y secuenciación de ADN	42
6.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	44
6.7 Digestiones y ligazones de ADN genómico	45
6.8 PCR Inverso (I- PCR)	46
6.9 PCR con iniciador único (SSP- PCR)	48
6.10 Análisis de secuencias de ADN y proteínas de <i>Leptospira</i>	50
7 RESULTADOS	52
7.1 Cultivo y extracción de ADN de <i>L. biflexa</i>	52
7.2 Amplificación de genes del <i>loci gsp</i> en <i>L. biflexa</i> por PCR	52
7.3 Identificación de los genes del <i>loci gsp</i> de <i>L. biflexa</i> serovariedad Patoc	63
7.4 Predicción de la estructura secundaria de GspD y GspE	81
7.5 Predicción de la estructura terciaria de GspD y GspE	89
8 DISCUSIÓN	90
9 CONCLUSIONES	105
10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
APÉNDICE I	120
APÉNDICE II	122
APÉNDICE III	124
APÉNDICE IV	125

ÍNDICE DE CUADROS

1.	Especies de <i>Leptospira</i> y 4 genopecies	6
2.	Serogrupos del género <i>Leptospira</i>	7
3.	Componentes del LPS de <i>L. borgpetersenii</i> y <i>L. interrogans</i>	12
4.	Especies del género <i>Leptospira</i> y sus porcentajes guanina- citosina (G-C)	31
5.	Iniciadores utilizados para la PCR	43
6.	Número de pares de bases de los genes <i>gspD</i> y <i>gspE</i> de leptospiaras	63
7.	Porcentaje de identidad nucleótido-nucleótido observada entre <i>gspD</i> y <i>gspE</i> de Patoc con sus homólogos en leptospiaras	64
8.	Identidad y similitud entre GspD y GspE de Patoc con los productos homólogos de las serovariedades patógenas de <i>Leptospira</i> y con otras bacterias	66
9.	Identidad de los genes <i>gspD</i> y <i>gspE</i> de Patoc con sus homólogos en leptospiaras patógenas mediante los programas BLASTn y ClustalW	67
10.	Porcentajes de identidad y similitud entre GspD y GspE de la serovariedad Patoc con sus homólogos en serovariedades de <i>Leptospira</i> y 14 bacterias Gram negativas	68
11.	Porcentaje de identidad de GspD entre leptospiaras patógenas y 14 bacterias Gram negativas	69
12.	Porcentaje de identidad de GspE entre leptospiaras patógenas y 14 bacterias Gram negativas	70
13.	Marcos abiertos de lectura (MAL) que codifican para las proteínas que constituyen los <i>loci gsp</i>	107
14.	Porcentaje de identidad entre las proteínas codificadas por los distintos MAL del <i>loci gsp</i> de <i>Leptospira</i>	108

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Triada epidemiológica de la leptospirosis	28
2. Vector pGKLep4	34
3. Secuencias de aminoácidos de GspD _L y GspE _L de la serovariedad Lai	42
4. Constantes de la PCR	45
5. Diagrama de flujo para la elaboración de un I-PCR	47
6. Diagrama de flujo para la elaboración de un SSP-PCR	49
7. Imagen de un gel de agarosa al 1% mostrando fragmentos de 1.5 kb de ADN	53
8. Identificación de <i>gspD</i> y <i>gspE</i> de la serovariedad Patoc	55
9. Alineación de las secuencias nucleotídicas de <i>gspD</i>	56
10. Alineación de las secuencias nucleotídicas de <i>gspE</i>	60
11. Dendograma con base en las homologías de GspD	71
12. Dendograma con base en las homologías de GspE	71
13. Alineación de aminoácidos de GspD de la serovariedad Patoc con sus homólogos en leptospiras y 5 Gram negativas	73
14. Alineación de aminoácidos de GspE de la serovariedad Patoc con sus homólogos en leptospiras y 5 Gram negativas	75
15. Alineación de aminoácidos de GspD de la serovariedad Patoc con sus homólogos en leptospiras patógenas	77
16. Alineación de aminoácidos de GspE de la serovariedad Patoc con sus homólogos en leptospiras patógenas	78
17. Secuencia de aminoácidos y dominio conservado de GspD de la serovariedad Patoc y 4 bacterias Gram negativas	79
18. Secuencia de aminoácidos y dominio conservado de GspE de la serovariedad Patoc y 4 bacterias Gram negativas	80
19. Alineación de aminoácidos y predicción de la estructura secundaria de la proteína GspD en leptospiras y 5 Gram negativas	82
20. Alineación de aminoácidos y predicción de la estructura secundaria de la proteína GspD en leptospiras y 5 Gram negativas	86
21. Modelo de la predicción de la estructura terciaria de GspE de la serovariedad Patoc	89
22. <i>Loci gsp</i>	106

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AM	Aglutinación Microscópica
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	tri-fosfato de adenosina
CI	Cromosoma I
CII	Cromosoma II
CO	Campo Oscuro
CTAB	Bromuro de cetil-trimetil-amonio
EDTA	Etilendiaminotetraacetado de sodio
EMJH	Ellinghausen & McCullough modificado por Johnson & Harris
G-C	Guanina- Citosina
GLP	Glicoproteína
<i>gsp</i>	General System Pathway
h	Hora
Ig	Inmunoglobulina
I-PCR	PCR-Inverso
IS	Secuencia de Inserción
kDa	Kilodaltones
KDO	Ácido ceto-deoxi-octanóico
Lip	Lipoproteína
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
MAL	Marco Abierto de Lectura
ME	Membrana Externa
MI	Membrana Interna
min	Minutos
ml	Mililitros
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PME	Proteína de Membrana Externa
PNM	Polimorfonucleares
SDS	Dodecil-sulfato de sodio
SSP-PCR	PCR con un sólo iniciador específico
SST-I	Sistema de Secreción Tipo I
SST-II	Sistema de Secreción Tipo II
SST-III	Sistema de Secreción Tipo III
SST-IV	Sistema de Secreción Tipo IV
SVs	Serovariedad (s)
TE	Solución amortiguada de Tris-EDTA
UV	Ultra Violeta
µg	Microgramos
µl	Microlitro

1 RESUMEN

Las espiroquetas del género *Leptospira* son el agente etiológico de la leptospirosis, una enfermedad infecciosa y contagiosa de importancia en los animales y seres humanos. Esta enfermedad se presenta en ambientes urbanos y rurales de países de todo el mundo. Actualmente se reconocen de 9 a 12 genespecies con más de 250 serovariedades (SVs) patógenas que están agrupadas en 23 serogrupos y 60 SVs no patógenas. La gran diversidad serológica entre leptospirosis, se atribuye a la diferencia entre la estructura y composición del lipopolisacárido (LPS). Por lo tanto, la mayoría de los trabajos sobre inmunidad en contra la leptospirosis se enfocan al estudio del LPS, que es el antígeno de superficie más importante de *Leptospira*. Otros antígenos de superficie que se han estudiado en *Leptospira*, son las proteínas de la membrana externa (PMEs). Las PMEs se han utilizado en ensayos de inmunidad obteniendo resultados medianamente satisfactorios. Algunas de estas proteínas muestran homología con proteínas del sistema de secreción tipo II (SST-II), que es el principal sistema por el cual la mayoría de las bacterias Gram negativas secretan proteínas como enzimas y toxinas. El presente trabajo tuvo como objetivo principal: identificar y secuenciar el gen *gspD_L* y *gspE_L* que codifica para una proteína del SST-II supelementalmente localizada en la membrana externa, de *L. biflexa* serovariedad Patoc, donde aun no se han identificado PMEs relacionadas con el SST-II. Los resultados obtenidos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), revelaron que la serovariedad Patoc posee genes que codifican para proteínas del SST-II y éstas son similares a sus homólogos en leptospirosis patógenas, además, al analizar la estructura secundaria de las proteínas se aprecia que su constitución es muy similar entre leptospirosis y semejante con homólogos de otras bacterias Gram negativas.

Palabras clave: *Leptospira*, serovariedad Patoc, sistema de secreción tipo II (SST-II), proteínas de membrana externa (PME), reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Reconocimientos

Este proyecto fue realizado en el laboratorio del Grupo de Investigación en *Leptospira* y Leptospirosis (Laboratorio 3305) del Departamento de Microbiología e Inmunología, FMVZ-UNAM. Proyecto financiado por los fondos PAPIIT (IN 205202) y UC-MEXUS -CONACYT (CN- 02-54). Responsable de proyecto y tutor principal, Dr. Alejandro de la Peña-Moctezuma.

ABSTRACT

The spirochaetes of the genus *Leptospira* are the causative agent of leptospirosis, an infectious and contagious disease of importance in animals and humans. Leptospirosis appears in urban and rural environments in around The world. Currently, 9 to 12 genospecies are recognized, with more than 250 pathogenic serovars (SVs) that are grouped in 23 serogroups and 60 nonpathogenic SVs grouped in 3 serogroups. The great serological diversity between leptospire is attributed to the difference between the structure and composition of the lipopolysaccharide (LPS). Therefore, most of the works to immunity in leptospirosis are focused on the study of the LPS, that is the most important antigen surface of *Leptospira*. Other surface antigens that have been studied in *Leptospira*, are the outer membrane proteins (OMPs). The OMPs have been used in immunity tests obtaining encouraging results. Some of these proteins show homology with proteins of the type II secretion system (T2SS) This system is responsible for secretion of external cellular enzymes and toxins by a wide variety of Gram-negative bacteria. In the present work we identified and sequenced *gspD_L* and *gspE_L*, genes that codify for two proteins of the T2SS. The product of *gspD_L* is putatively located in the outer membrane of *L. biflexa* serovar Patoc. The results obtained by the polymerase chain reaction (PCR), revealed that serovar Patoc has genes that codify for proteins of the T2SS and these are similar to their homologues in pathogenic leptospire, in addition, analyzing the secondary structure of the encoded proteins their constitution is similar between leptospiras and their homologues in other Gram-negative bacteria.

Key words: *Leptospira biflexa*, Patoc, type II secretion system (T2SS), outer membrane proteins (OMP), polymerase chain reaction (PCR).

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Leptospirosis

La leptospirosis es una zoonosis, ésto es, transmitida de los animales al hombre, que prevalece en el mundo con brotes emergentes y es producida por espiroquetas patógenas del género *Leptospira* (Hartskeerl, 2005; Levett, 2001). Es una enfermedad infecciosa que se trasmite por contacto con orina de animales infectados o con cualquier medio líquido contaminado con esta bacteria (Levett, 2001). La enfermedad se presenta en ambientes urbanos y rurales de países desarrollados y subdesarrollados (Bharti *et al.*, 2003).

Los signos clínicos que se presentan en el ser humano y en los animales son muy variados (Levett, 2001). La mortalidad causada por estos microorganismos en humanos es significativa (350,000 a 500,000 casos graves de leptospirosis anualmente en el mundo, Hartskeerl, 2005) en algunas regiones del mundo, como India o el sureste de Asia y regiones tropicales de América como Brasil, Cuba y Centroamérica. Sin embargo, la enfermedad está presente también en el resto del mundo con presentaciones subclínicas así como sintomatología muy diversa que incluye: hemorragias, mialgias, artralgias, ictericia y otros asociados a insuficiencia renal (Bharti *et al.*, 2003).

En animales domésticos de producción, como bovinos, pequeños rumiantes y cerdos, hay pérdidas económicas significativas que generalmente se asocian con abortos e infertilidad y disminución de la producción láctea. Por otro lado, en animales de trabajo, deporte y compañía como équidos y caninos se pueden observar cuadros clínicos muy diversos que hacen difícil su diagnóstico (Richtzenhain *et al.*, 2002; Ellis, 2005).

En términos generales, la infección se caracteriza, por causar daño a: hígado, riñones, pulmones, cerebro, placenta y músculos (Faine *et al.*, 1999). Algunos de los nombres con los que se conoce esta enfermedad son: enfermedad de las porquerizas, enfermedad de los porqueros, enfermedad de Stuttgart, enfermedad de Weil, fiebre de los arrozales, fiebre canícola, fiebre de los cañaverales, fiebre del cieno, ictericia espiroquética (Acha y Szyfres, 2001; Chin, 2001).

2.2 Etiología

Anteriormente, la clasificación del género *Leptospira* se basó en las propiedades patogénicas del microorganismo, lo cual dio como resultado dos especies: *L. interrogans* que agrupaba a todas las serovariedades patógenas y *L. biflexa* que agrupaba a las serovariedades saprófitas. Actualmente, el género incluye las siguientes siete especies patógenas y dos especies indeterminadas: *L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai* y *L. weillii*. Además, hay tres especies apatógenas *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*. Hay cuatro genopecies que no han sido clasificadas taxonómicamente (Brenner *et al.*, 1999). Las especies actuales se han establecido a partir de estudios basados en homología de ADN y ensayos de hibridación de ácidos nucleicos (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001).

2.3 Clasificación Taxonómica

El género *Leptospira* se encuentra clasificado en el Phylum y Clase *Spirochaetes*, Orden de los *Spirochaetales* y Familia *Leptospiraceae*; esta Familia esta compuesta por los géneros: *Leptonema*, *Leptospira* y *Turneria* (Cavalier-Smith, 2002).¹ Todas las leptospiras son morfológicamente similares, pero en el fenotipo y genotipo hay diferencias. Es por esto, que los criterios convencionales para la clasificación bacteriológica (características de cultivo, actividad y propiedades químicas), no son suficientes para la clasificación de las especies patógenas de *Leptospira* (Faine *et al.*, 1999).

La clasificación serológica de esta bacteria continúa en la organización de serogrupos y termina con la designación de serovariedades, cuando las serovariedades comparten similitud de antígenos son agrupadas dentro de un serogrupo (Kmety and Dikken, 1993; Faine *et al.*, 1999). Los serogrupos, no están exactamente definidos y no tienen una implicación taxonómica, estos

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/>

fueron creados por el número creciente de serovariedades, de tal manera que fue apropiado hacer grupos pequeños donde las serovariedades incluidas tienen un alto grado de homogeneidad y relación antigénica. Los serogrupos tienen utilidad para el diagnóstico y para realizar análisis epidemiológicos. Las pruebas que se realizan para agrupar a las serovariedades en serogrupos y para designar a las serovariedades son pruebas de aglutinación con sueros hiperinmunes generados en conejos e incluye la de aglutinación microscópica (AM) y la prueba de absorción cruzada, así como la identificación con anticuerpos monoclonales (Kmety and Dikken, 1993; Faine *et al.*, 1999).

Más recientemente, se han utilizado análisis de patrones de fragmentos de ADN generados por digestión con endonucleasas de restricción y otras técnicas moleculares, como secuenciación de los genes *rrs* (16S) y *rpl* (23S) del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) (Perolat *et al.*, 1990; Ramadas *et al.*, 1992; Postic *et al.*, 2000).

Actualmente, se reconocen 28 serogrupos que agrupan alrededor de 300 serovariedades,¹ de los cuales 23 agrupan poco más de 250 serovariedades patógenas y de éstas, 228 serovariedades están completamente caracterizadas (Brenner *et al.*, 1999; Faine *et al.*, 1999). Existen algunas serovariedades que incluyen subtipos, como el caso de la serovariedad Hardjo, con los subtipos Hardjoprajtino y Hardjobovis. Es importante mencionar que estos dos subtipos pertenecen a dos distintas especies (*L. interrogans* y *L. borgpetersenii* respectivamente), pero son serológicamente indistinguibles, aun utilizando anticuerpos monoclonales (Farrelly *et al.*, 1987; de la Peña-Moctezuma, 1999). En el Cuadro 1 se enlistan las especies actualmente reconocidas del género *Leptospira* y en el Cuadro 2 los serogrupos. Según Kmety y Dikken (1993), es importante mencionar que, cuando se describe una serovariedad, se deben incluir: nombre de la serovariedad, nombre de la cepa tipo, serogrupo al que pertenece, especie genética a la que pertenece, país de origen y la fuente del aislamiento.

¹ <http://www.pasteur.fr/recherche/Leptospira/Strains.html>. 2006

Cuadro 1. Especies de *Leptospira* y 4 genopecies.

1. <i>Leptospira alexanderi</i> ^a
2. <i>Leptospira biflexa</i> ^c
3. <i>Leptospira borgpetersenii</i> ^a
4. <i>Leptospira fainei</i> ^b
5. <i>Leptospira inadai</i> ^b
6. <i>Leptospira interrogans</i> ^a
7. <i>Leptospira kirschneri</i> ^a
8. <i>Leptospira meyeri</i> ^c
9. <i>Leptospira noguchii</i> ^a
10. <i>Leptospira santarosai</i> ^a
11. <i>Leptospira weillii</i> ^a
12. <i>Leptospira wolbachii</i> ^c
Genoespecie 1
Genoespecie 3
Genoespecie 4
Genoespecie 5

a = patógena; b = indeterminada; c= saprofítica.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/>

2.4 Características generales del género *Leptospira*

El método estandarizado para observar espiroquetas como *Leptospira* es la microscopía de campo oscuro (CO) en preparaciones húmedas o bien mediante tinciones argénticas, como Levaditi o Warthin Starry, aplicadas a tejidos. (Quinn *et al.*, 1994).

El cuerpo de este microorganismo es helicoidal o en forma de espiral sutil, que mide de 6 a 20 µm de largo por 0.1 a 0.2 µm de ancho. Es altamente móvil gracias a un mecanismo de dos flagelos periplásmicos (endoflagelos) que se sitúan entre el espacio de la pared celular y la membrana externa, insertos en un cuerpo basal y están anclados en los extremos de la espiroqueta. Los discos del cuerpo basal donde se anclan, son similares a los de las bacterias Gram negativas. El movimiento que generan es de rotación sobre su eje central, contorción y translocación por movimientos ondulatorios (Ritchie and Ellinghausen, 1965; Holt, 1978; Quinn *et al.*, 1994). Es

importante señalar que, estos endoflagelos están compuestos en su mayoría por proteínas muy similares a flagelinas y son termoestables a 60° C (Holt, 1978).

Cuadro 2. Serogrupos del género *Leptospira*

Número	Serogrupo	Serovariedad Representativa	Cepa
1.	Andamana *	Andamana	CH 11
2.	Australis	Australis	Ballico
3.	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
4.	Ballum	Ballum	Mus 127
5.	Bataviae	Bataviae	Swart
6.	Canicola	Canicola	Hond Utrech IV
7.	Celledoni	Celledoni	Celledoni
8.	Codice *	Codice	CDC
9.	Cynopteri	Cynopteri	3522 C
10.	Djasiman	Djasiman	Djasiman
11.	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
12.	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
13.	Holland ⁺	Holland	WaZ Holland
14.	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
15.	Javanica	Javanica	Veldrat Bataviae 46
16.	Louisiana	Louisiana	LSU 1945
17.	Lyme*	Lyme	10
18.	Manhao	Manhao 4	Li 130
19.	Mini	Mini	Sari
20.	Panama	Panama	CZ 241
21.	Pomona	Pomona	Pomona
22.	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
23.	Ranarum	Ranarum	ICF
24.	Sarmin	Sarmin	Sarmin
25.	Sejroe	Hardjo	Hardjobovis ó Hardjoprajitno
26.	Semaranga *	Patoc	Patoc I
27.	Shermani	Shermani	1342K
28.	Tarassovi	Tarassovi	Mitis Johnson

Serogrupos del género *Leptospira*, incluye los serogrupos de especies patógenas y no patógenas (*), nuevos serogrupos (+). Todos con la serovariedad y la cepa de referencia utilizada para determinar identidad antigénica. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/>; Faine *et al.*, 1999).

Sin los endoflagelos, *Leptospira* no tiene movilidad y pierde los ganchos de los extremos, característicos del género (Bromley and Charon, 1979; Picardeau *et al.*, 2001). Además, la presencia de los ganchos en los extremos se ha asociado como un factor de virulencia en estudios en conejillo de indias y hámster (Faine and Hoeden, 1964). La cubierta o pared (cilindro protoplasmático), está formada por el complejo del peptidoglicano, constituido por ácido murámico, glucosamida y ácido diaminopimélico y la membrana externa tiene una organización muy similar a la de las bacterias Gram negativas (Adler and de la Peña-Moctezuma, 2004). Químicamente, las leptospiras están compuestas por: 46.0% de proteínas, 27.0% de carbohidratos y 22.0% de lípidos. La membrana externa está compuesta por fosfolípidos en 98.0%, constituida de fosfatidiletanolamina, ácido hexaecaenóico y ácido octadecanóico. El lipopolisacárido (LPS) está constituido en general, por: hexosas, heptosas, hexosaminas, deoxihexosas, pentosas y ácido ceto-deoxi-octanoico (KDO) (Holt, 1978). Más adelante, se hablará sobre el LPS y otras moléculas de la superficie de *Leptospira*.

Se ha tratado de diferenciar las leptospiras patógenas de las saprófitas, basándose en las características de morfología colonial y algunas actividades bioquímicas como la lisis del ácido oleico y la producción de catalasa (Stalheim and Wilson, 1963). Se ha observado que, según el grado de pases que tenga una cepa de leptospiras patógenas, la morfología colonial puede cambiar (Wood *et al.*, 1981). Sin embargo, se ha podido diferenciar a las leptospiras patógenas de saprófitas en tres grupos con base en su desarrollo con inhibidores como 2-6 diaminopurina y 8-azaguanina, además de la actividad enzimática de lipasa. El primer grupo puede desarrollarse en presencia de los dos análogos de las purinas (10 µg/ml 2-6 diaminopurina y 200 µg/ml de 8-azaguanina) y tiene actividad de lipasa; el segundo, sólo puede desarrollarse en presencia de un análogo (2-6 diaminopurina) pero no tiene actividad de lipasa, estas características son de leptospiras patógenas; y finalmente el tercer grupo, leptospiras saprófitas, éstas se desarrollan en presencia de ambos análogos de purinas y conservan la actividad de lipasa (Johnson and Harris, 1968).

2.5 Consideraciones biológicas para el cultivo *in vitro* de *Leptospira*

Las leptospiras son bacterias aerobias obligadas con un periodo generacional de 6 a 8 horas (h) en las cepas patógenas y muy similar en cepas saprófitas, aunque *L. biflexa* se puede dividir en un lapso menor si la temperatura es modificada y son cultivadas con sistemas de agitación, reduciendo su periodo generacional a 4.5 h a 30°C o 3.4 h a 34°C (Faine *et al.*, 1999). El desarrollo de los cultivos se aprecia por la turbidez o zonas de turbidez anulares (anillos de Dinger) en los medios semisólidos, el tiempo de desarrollo macroscópico de leptospiras en un medio varía entre 3 a 10 días o varias semanas. El rango de temperatura en el que se desarrollan los cultivos de leptospiras *in vitro* es de 11 a 13° C para leptospiras saprófitas y para leptospiras patógenas la temperatura óptima es de 28 a 30° C, sin embargo, las leptospiras saprófitas también se pueden desarrollar de 28 a 30° C, pero las patógenas no desarrollan de 11 a 13° C (Johnson and Harris, 1967; Finn and Jones, 1976; Myers, 1985).

En las muestras clínicas, es importante preveer posibles contaminaciones, por lo cual, en los medios para realizar los primo-aislamientos se deben adicionar inhibidores como: 5-fluorouracilo, sulfato de neomicina o furazolidona (Myers, 1985). Es importante que las muestras tengan un pH de 6.0 a 8.0 y en casos de sospecha de contaminación, además, es importante filtrar las muestras con membranas de 0.45 µm y 0.22 µm (Myers, 1985). Para obtener un aislado a partir de muestras de mamíferos, dichas muestras pueden ser incubadas inicialmente a 37° C.

El pH óptimo para el desarrollo de este género bacteriano es de 7.2 a 7.6 y es muy sensible en medios que tengan un pH por debajo 6.8 (Stalheim and Wilson, 1964). En condiciones de anaerobiosis no sobrevive por debajo de un factor de 0.250 E_h (potencial de óxido reducción ambiental), el oxígeno es considerado como un factor importante de crecimiento (Faine *et al.*, 1999). La concentración de iones también es un factor importante a considerar, por ejemplo, el cloruro de sodio es fundamental para algunas especies de leptospiras, sobretodo las halófitas, y para algunas otras especies, puede ser un factor inhibitorio cuando son cultivadas a 37° C (Faine,

1959). Un ión fundamental para el desarrollo de *Leptospira* es el hierro, otros iones necesarios son el calcio, el cobre y el magnesio (Johnson and Gary, 1963). La bacteria es muy sensible a la desecación, ya sea en el medio o en condiciones *in vitro* (Faine *et al.*, 1999).

Las leptospiras utilizan ácidos grasos de 12 a 18 carbonos como fuente de energía, las fuentes más comunes para proporcionar esos ácidos grasos son la albúmina sérica bovina y el suero de conejo, que se adicionan a los medios de cultivo estandarizados (líquidos y sólidos) (Johnson and Wilson, 1960; Johnson and Walby, 1972). También se pueden utilizar como fuentes de carbono, polisorbato (tween), glicerol y acetato. Como fuente de nitrógeno comúnmente se usan sales de amonio. Para el cultivo y desarrollo óptimo de las leptospiras se usan además las vitaminas tiamina (B₁) y cianocobalamina (B₁₂), o metabolitos de la glucosa como el piruvato de sodio (Johnson *et al.*, 1973; Faine *et al.*, 1999). Los medios para el cultivo de *Leptospira* pueden ser líquidos, semisólidos y sólidos. En el Apéndice I se hace una síntesis de los medios y sus fórmulas, más utilizados para el desarrollo de *Leptospira in vitro*.

Dada la complejidad para preparar los medios estandarizados, se han estandarizado otros medios de cultivo para *Leptospira*, donde solamente se han utilizado cloruro de sodio e hidróxido de potasio, más una mezcla de suero de carnero joven, este medio ofrece un índice bajo de cepas no viables (Rodríguez *et al.*, 1998). Sin embargo, el medio descrito por Ellinghausen & McCullough modificado por Johnson & Harris (EMJH) es el más utilizado (Johnson and Harris, 1967).

Por otro lado, se han probado medios comerciales estandarizados con detección de crecimiento automatizada (cultivos para aerobios, anaerobios, micobacterias y hongos), para el primocultivo de leptospiras a partir de muestras clínicas de humanos. Los medios estandarizados para aerobios y micobacterias han mostrado ser útiles para crecer leptospiras, obteniendo aislados a partir de 9° día de incubación (Griffith *et al.*, 2005).

2.6 Antígenos estructurales de *Leptospira*

2.6.1 Lipopolisacárido (LPS)

El LPS es el mayor antígeno de superficie del género *Leptospira* el cual le da especificidad serológica y es la base de la diversidad antigénica de las serovariedades que componen a este género (Bulach *et al.*, 2001). El LPS de *Leptospira* tiene una organización semejante al de las bacterias típicas Gram negativas (Kalambaheti *et al.*, 1999). El LPS está constituido por tres regiones: a) una cadena repetitiva de carbohidratos (polisacárido) o antígeno O; b) una región lipídica, conocida como lípido A, que une al LPS con la membrana externa y que es la fracción tóxica del LPS (endotoxina) y c) un polisacárido central, que une al antígeno O con el lípido A (Bulach *et al.*, 2001; Caroff *et al.*, 2002). El LPS de *Leptospira* es la estructura que interacciona con receptores del el hospedador y juega un papel importante en la inmunidad y en la clasificación serológica. El LPS es una estructura antigénicamente activa, pero a pesar de que es similar al LPS de bacterias Gram negativas, no genera la misma actividad biológica (patogenicidad). Sin embargo el LPS genera anticuerpos circulantes, aglutinantes y opsónicos (Kalambaheti *et al.*, 1999). Cuando se le comparó con el LPS de *E. coli*, se observó que el LPS de *Leptospira* fue alrededor de 12 veces menos potente (Isogai *et al.*, 1986, Isogai *et al.*, 1990).

Se ha estudiado al LPS en procesos infecciosos agudos y crónicos, encontrando que la capa de LPS se encuentra reducida cuando está en los tejidos en fases agudas de la enfermedad, en comparación de cuando se encuentra *in vitro*. Sin embargo, cuando se comparó el LPS de *Leptospira* en infecciones renales crónicas con el LPS de leptospiras cultivadas *in vitro*, éste fue indistinguible. Por otro lado, también se comparó el LPS de leptospiras en hígado y riñón, donde se observó que en hígado (fase aguda) el LPS estaba disminuido. Esto sugiere que hay una regulación de la expresión del LPS dependiente del tipo de tejido del hospedador (Nally *et al.*, 2005). El LPS de *Leptospira* está compuesto por 54.0% de carbohidratos, 12.0% de lípidos y 5.0% de proteínas (Isogai *et al.*, 1986). Con pentosas, hexosas, heptosas, hexosaminas y KDO

similares a las bacterias Gram negativas (Vinh *et al.*, 1986). En el Cuadro 3 se enlistan los componentes más comunes del LPS de *Leptospira*.

Este microorganismo se caracteriza porque es incapaz de usar carbohidratos exógenos como fuentes de carbono, así que todos los carbohidratos que se incorporan al LPS deben ser sintetizados *de novo* (Bulach *et al.*, 2001). Se han realizado modelos de la composición del lípido A de *Leptospira* y los modelos sugieren que este lípido es similar al de otras bacterias Gram negativas con ciertas diferencias. Por ejemplo, el LPS de *Leptospira* tiene dos cadenas secundarias del grupo acyl (Que-Grewirth *et al.*, 2004). A pesar de la importancia en inmunología y diagnóstico, es relativamente poco lo que se sabe sobre la organización genética y la composición química del LPS de *Leptospira* (Bulach *et al.*, 2001).

Cuadro 3. Componentes del LPS de *L. borgpetersenii* y *L. interrogans*

Lípidos	Carbohidratos
Decanoico	Arabinosa*
Hidroxidecanoico	Fucosa
Laurico	Galactosa
Tridecanoico	Galactosamina
Tetradecanoico	Glucosamina
Pentadecanoico	Manosa
Hidroxipentadecanoico	Rhamnosa*
Hexadecanoico (plamítico)	Ribosa
Hexadecanoico (palmitoleico)	Xilosa*
Hidroxipalmítico	
Hydoxiheptadecanoico	
Octadecanoico	

(*) = más comunes (Isogai *et al.*, 1986; Faine *et al.*, 1999).

2.6.2 *Locus rfb*, genes para la biosíntesis del LPS

El *locus* que incluye a los genes que codifican para la biosíntesis del LPS es llamado *rfb* y su tamaño es aproximadamente de 120 kilobases (kb) en la serovariedad Hardjobovis (Adler *et al.*, 2005). Este consiste de aproximadamente 117 marcos abiertos de lectura (MAL) que están orientados en la misma dirección, haciendo de éste uno de los *loci* más largos descrito en la

literatura (de la Peña *et al.*, 1999; Adler *et al.*, 2005). En este *locus* se han identificado genes que codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis del LPS, incluyendo síntesis, procesamiento, transporte y ensamblaje de carbohidratos estructurales del LPS (Bulach *et al.*, 2001). La síntesis y ensamblaje de las subunidades del antígeno O empieza en la superficie de la cara interna de la membrana citoplasmática (citoplasma) y posteriormente es llevado a la superficie de la bacteria a través de la membrana externa por medio de proteínas integrales de transporte, probablemente por transportadores del tipo ABC (*ATP binding cassette*) o transportadores del sistema de secreción tipo I (SST-I). El transporte se puede dar por dos vías, la polimerasa Wzy o bien una glicosiltransferasa, para finalmente unirse en la superficie al lípido A y al núcleo del LPS (Kalambahethi *et al.*, 1999).

La serovariedad Hardjo contiene los subtipos Hardjoprajitno, de la especie *L. interrogans* y Hardjobovis de la especie *L. borgpetersenii*, ambos subtipos son serológicamente indistinguibles a pesar de pertenecer a diferentes especies (de la Peña-Moctezuma *et al.*, 1999). Genéticamente, existen diferencias en la organización de los *loci rfb*, en ambos subtipos sus *loci* son muy similares hacia el extremo 3' y la orientación y el orden de los MAL es idéntico en las últimas 32 (Hardjoprajitno) o 31 MAL (Hardjobovis). Además, se encontró que las regiones *orfJ1* a *orfJ14*, también como *orfJ21* a *orfJ22*, de ambos subtipos de Hardjo, son muy similares. Por otro lado las *orfJ15* a *orfJ20* y *orfJ23* a *orfJ31* de Hardjoprajitno son casi idénticas (95% de identidad) con sus homólogos en *L. interrogans* serovariedad Copenhageni pero muestran menor identidad respecto a Hardjobovis. Se ha planteado la hipótesis por este motivo, que la serovariedad Copenhageni probablemente adquirió las regiones de MAL 1 a 14 y 21 a 22, en forma horizontal a partir de Hardjobovis, surgiendo así el subtipo Hardjoprajitno y resultando en dos subtipos serológicamente indistinguibles adaptados al bovino.

En otras serovariedades, también se han encontrado diferencias en los *loci rfb*, donde se han analizado, incluyendo Hardjoprajitno de *L. interrogans* y Hardjobovis de *L. borgpetersenii*, que pertenecen al serogrupo Sejroe y las serovariedades: Autumnalis, Australis, Canicola,

Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Lai, Mwoyolo, Naam, Pomona, Pyrogenes, Smithi; todas pertenecientes a la especie *L. interrogans* (de la Peña-Moctezuma *et al.*, 2001). La diferencia entre estas últimas serovariedades con Hardjoprajitno y Hardjobovis, se encontró río arriba de *orf11* en donde la presencia de cinco MAL que codifican para una epimerasa (*orf32*), una glicosiltransferasa (*orf33*), dos proteínas integrales de membrana (*orf34* y *35*) y una galactosiltransferasa (*orf37*) (las serovariedades Australis, Pomona y Autumnalis no poseen *orf37*) sustituyen las *orf1* a *orf9* de Hardjoprajitno y Hardjobovis. Estas diferencias sugieren su posible utilidad para dar identidad a cada una de las serovariedades con base en sus secuencias en los *loci rfb* (de la Peña-Moctezuma *et al.*, 2001). Por otro lado, regiones de los *loci rfb*, como *orf14* y la región intergénica *orf16* a *orf17* se han usado para distinguir a las serovariedades Autumnalis, Ballum, Patoc, Tarassovi por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Aparentemente, estas regiones muestran secuencias específicas que permiten distinguir las entre sí (Kalambaheti *et al.*, 2005).

Para tratar de entender las funciones de cada gen del LPS, se han clonado genes *rfb* en sistemas heterólogos para tener genes de LPS recombinantes y así usar las mutaciones de otros microorganismos para complementación genética (Bulach *et al.*, 2000). Se han usado, *orfH10* para complementar *wbpM* de *Pseudomonas aeruginosa*, *orfH13* para *rfbW* de *V. cholerae*, *orfH11* para *wccC* de *E. coli* y *orfH8* para *galE* de *Salmonella entérica* serovariedad Typhimurium. Pocos resultados se encontraron, ya que *orfH10* no transcribe o porque *orfH13* no fue expresada. Son necesarias las mutantes isogénicas para la evaluación funcional de los genes, las cuales no existen en las serovariedades patógenas del género *Leptospira* (Bulach *et al.*, 2000). Por otro lado, hay datos que sugieren que la regulación del *locus rfb* es termo-dependiente, por lo menos en la región intergénica *orf14* a *orf15* en donde se ha encontrado una estructura secundaria con características de regulador de la transcripción que fue capaz de regular la expresión de resistencia a kanamicina y β - galactosidasa a 30 y 37° C, pero no a 25 ni 42° C, cuando fue clonada en *E. coli* (de la Peña-Moctezuma, 2002; Carillo-Casas *et al.*, 2005). Finalmente, la

estructura del LPS de *Leptospira* aun espera ser aclarada (Kalambaheti *et al.*, 1999, de la Peña-Moctezuma *et al.*, 2001; Bulach *et al.*, 2001; Kalambaheti *et al.*, 2005).

2.6.3 Proteínas de membrana externa (PME)

La cubierta externa del género *Leptospira* está compuesta por membrana externa y membrana interna, más una pared de peptidoglicano, similar a las bacterias Gram negativas sin embargo, carece de espacio periplásmico (Haake, 2000; Zuerner *et al.*, 2000; Haake and Matsunaga, 2005).

Los primeros indicios de que la superficie de *Leptospira* (Grippotyphosa) tenía cambios significativos *in vitro*, fueron determinados por medio de microscopia electrónica de criofractura. Se comparó una cepa virulenta y una atenuada observando que proteínas determinadas (41 y 44 kDa) se manifestaban tanto en la cepa virulenta como en la atenuada; mientras que otra proteína de 33 kDa sólo se observó en la cepa atenuada (Haake *et al.*, 1991). Por otro lado, se demostró que algunas proteínas se expresan en la superficie de *Leptospira* en condiciones *in vitro* y otras *in vivo* (Nicholson and Prescott, 1993).

Dos de las proteínas estudiadas por Haake *et al.*, (1991), designadas como OmpL1 y LipL41, fueron las primeras proteínas de la membrana externa de *Leptospira* que se caracterizaron (Zuerner *et al.*, 1991; Haake *et al.*, 1993). En la serovariedad Pomona de *L. interrogans* se empezaron a caracterizar las proteínas de la membrana externa y las proteínas secretadas al medio. Se extrajeron 5 proteínas hidrofóbicas (22, 25, 31, 36 y 42 kDa), además de una potencial hemolisina de 60 kDa que se secreta al medio (Zuerner *et al.*, 1991).

La proteína de mayor abundancia fue la de 31 kDa, una proteína termolábil y antigénica, corroborando su peso a 32 kDa en estudios posteriores (Zuerner *et al.*, 1991; Haake *et al.*, 2000; Zuerner *et al.*, 2000). La proteína Hap1 o LipL32 es la más abundante en la membrana externa, ha sido detectada *in vitro* e *in vivo* (túbulos renales de hámstere) (Haake *et al.*, 2000). Y se ha encontrado similitud con otras lipoproteínas de procariontes (Lee *et al.*, 2000). Esta proteína es reconocida por anticuerpos de sueros de pacientes convalecientes y tanto estructural como

genéticamente está conservada entre las especies patógenas de *Leptospira* (Zhang *et al.*, 2005). En varios estudios se ha demostrado que las lipoproteínas (LipL32 y LipL41) son expresadas durante un proceso infeccioso, generando anticuerpos de tipo IgG, ésto sugiere que las proteínas pudieran jugar un papel importante en la patogenicidad del microorganismo, aunque se desconoce el mecanismo de acción (Guerreiro *et al.*, 2001).

La proteína de 33 kDa OmpL1 es transmembranal, la secuenciación reveló que la predicción de la estructura secundaria posee hojas- β anfipáticas, clásica de proteínas de la membrana externa y parecida a las porinas de bacterias Gram negativas. Además, se observó que está expuesta en la superficie (Haake *et al.*, 1993; Shang *et al.*, 1995). Ensayos de hibridación de ADN demostraron que OmpL1, se encuentra presente en la mayoría de leptospiras patógenas (*L. interrogans*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*) y no en apatógenas (*L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*) (Haake *et al.*, 1993). Y estructural y genéticamente se conserva entre especies patógenas (Zhang *et al.*, 2005). La OmpL1 se ha detectado en riñón de hámster entre 10 y 28 días postinfección (dpi) y junto con el LPS, se detectó en fagocitos intersticiales (Barnett *et al.*, 1999).

La lipoproteína LipL41 está expuesta en la superficie, ensayos de inmunotransferencia indican que es altamente conservada entre las especies patógenas y no se ha encontrado en especies apatógenas (Shang *et al.*, 1996). También se ha observado la expresión de LipL41 en riñón de hámster, después de 10 y 28 dpi (Barnett *et al.*, 1999). Ensayos de PCR e inmunotransferencia han corroborado que los genes *ompL1* y *lipL41* están conservados entre especies patógenas (serovariedades Lai y Andamana) de distintas regiones geográficas (Natarajaseenivasan *et al.*, 2005).

La LipL45 es otra proteína antigénica y se ha estudiado en *L. kirschneri* serovariedad Grippytyphosa, ésta puede dejar de detectarse en aislamientos que tienen un alto pasaje o cultivos atenuados. Los anticuerpos contra LipL45, también reconocen otra proteína de 31 kDa que se deriva a partir del carboxilo amino terminal de LipL45; Así que, fue denominada P31_{LipL45}, que

aparentemente es una proteína periplásmica cuya expresión se incrementa cuando los cultivos llegan a la fase estacionaria (Matsunaga *et al.*, 2002).

Otra lipoproteína que se ha estudiado es LipL36, que se expresa abundantemente al inicio de la fase logarítmica en *L. kirschneri*, sin embargo, la expresión se reduce considerablemente en la fase media logarítmica. Esta proteína induce anticuerpos en hámster, pero al ser enfrentada contra sueros de pacientes convalecientes de leptospirosis no se detectaron reacciones. Esto sugiere que, parte de la expresión de las proteínas está relacionada con el hospedador (Haake *et al.*, 1998). La lipoproteína LipL36 es exportada a la membrana al igual que la proteína LipL41 y el LPS, sin embargo, al realizar estudios de expresión por medio de inmunohistoquímica en tejido renal de hámster, se detectaron OmpL1 y LipL41, sin detectar LipL36, sugiriendo que LipL36 no es expresada *in vivo* (Barnett *et al.*, 1999). En el 2000, se reportó que una proteína del mismo peso (36 kDa), se asocia con la unión a la fibronectina, sugiriendo un papel potencial como adhesina. Esta proteína de 36 kDa, fijadora de fibronectina, está en especies virulentas pero no en avirulentas (Mèrien *et al.*, 2000).

La segunda lipoproteína más abundante en la superficie de la membrana externa de *L. interrogans* serovariedad Lai es LipL21. Por ensayos de hibridación tipo *Southern* con el gen que codifica para esta proteína como sonda, se encontró que el gen se encuentra en las especies patógenas y está ausente en las apatógenas. Además, la secuenciación de los genes muestra que hay del 96 al 100% de identidad (Cullen *et al.*, 2003). Es una proteína que está conservada genéticamente entre especies patógenas y no reacciona con anticuerpos de pacientes convalecientes (Zhang *et al.*, 2005).

Por otro lado, se ha reportado que la regulación de la expresión de algunas proteínas está dada por la temperatura, ensayos *in vitro* a 30 y 37° C revelaron que hay diferencias en la expresión de proteínas en las dos membranas de la bacteria (Nally *et al.*, 2001). A diferencia de LipL36 que no se expresa a 37° C o LipL41 que se expresa a cualquier temperatura, una proteína de 20 kDa que se sitúa en el periplasma reduce o apaga su expresión a 37° C. Una proteína de 25

kDa y otra de 66 kDa aumentan su expresión a mayor temperatura, sin embargo, la primera es de membrana externa y la segunda es de periplasma.

Recientemente, se ha reportado que la proteína OmpL52 tiene la característica de incrementar su expresión en la fase estacionaria en *L. santarosai* serovariedad Shermani; ésta es otra proteína identificada en leptospiros patógenas y ausente en apatógenas y es probable que su función sea similar a OmpA de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. multocida* (Hsieh *et al.*, 2005).

Hay proteínas que se han sugerido como candidatos para el desarrollo de vacunas o métodos diagnósticos, por su capacidad de producción de anticuerpos, sin embargo, no se ha aclarado todavía su ubicación en la superficie de *Leptospira*, como el reciente reporte de P-50, la cual es reconocida fuertemente por anticuerpos de tipo IgM de humanos y muestra ser un antígeno altamente específico de *Leptospira* (Pol Sea and Bharadwaj, 2005). Cullen *et al.*, (2002) reportaron 8 nuevas lipoproteínas en *Leptospira interrogans* serovariedad Lai (pL18, pL22, pL24, pL45, pL47/49, pL50 y pL55). Ensayos de electroforesis de doble dimensión, mostraron diferencias en la expresión al incubar a la serovariedad Lai bajo diferentes condiciones (incubación a 20, 30, 37° C; presencia o ausencia de suero y Fe⁺ en el medio de cultivo).

Una de las proteínas cuya expresión fue constante bajo las distintas condiciones fue pL18. Con base en estos estudios, la secuencia parcial de aminoácidos del extremo amino terminal de pL18, fue comparada con secuencias codificadas en el genoma de la serovariedad Hardjobovis y el análisis reveló una similitud del 46.0 a 66.0% con GspG de otras bacterias, una proteína del sistema de secreción tipo II (SST-II). El SST-II es el principal mecanismo de secreción protéica en bacterias Gram negativas y ha sido descrito en bacterias como *L. pneumophila*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *E. coli* (Sandkvist, 2001^a). El supuesto *locus* del SST-II de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjobovis) fue analizado y se encontraron 13 MAL en la misma dirección (de la Peña-Moctezuma *et al.*, 2002). Cuatro MAL río arriba de la supuesta *gspG* se encontró un gen que codifica para un homólogo de GspD, la supuesta secretina del SST-II, la

cual se encuentra situada sobre la membrana externa de las bacterias Gram negativas que la poseen. Estas proteínas están conservadas en otras serovariedades y son antigénicas en el subtipo Hardjobovis de *L. borgpetersenii* (de la Peña-Moctezuma *et al.*, 2002; Rodríguez-Reyes *et al.*, 2005).

Se ha reportado otro grupo de proteínas, semejantes a las de la superfamilia de las inmunoglobulinas bacterianas (Big-bacterial immunoglobulin), en la superficie de leptospiras patógenas. La secuencia de *ligA*, *B* y *C* en *L. interrogans* y *L. kirschneri*, revelaron que *ligC* es un pseudogen que contiene mutaciones que rompen el MAL, estos genes están presentes en leptospiras patógenas y ausentes en apatógenas (Matsunaga *et al.*, 2003). Ensayos de inmunohistoquímica, revelaron que LigA se expresa *in vivo* en riñones de hámsteres, en comparación con cultivos *in vitro* donde no se ha detectado por inmunotransferencia, lo que sugiere que LigA sólo se expresa *in vivo* (Palanippan *et al.*, 2002). Además, se ha relacionado la expresión de LigA y LigB, con la osmolaridad (NaCl, KCl y Na₂SO₄) y con el número de pasajes de un cultivo *in vitro* (Matsunaga *et al.*, 2005).

Hay otro reporte sobre una proteína con dominios en la región carboxilo terminal, similares a OmpA (Loa22), que igualmente sólo se encuentra en serovariedades patógenas (Koizumi and Watanabe, 2003). Las PME se pueden recuperar a partir de la purificación de vesículas de la membrana externa. Aparentemente, estos métodos facilitan la definición de la masa molecular, utilizando electroforesis de doble dimensión y espectrofotometría de masas (Nally *et al.*, 2005). También, se han identificado otras nuevas proteínas a partir de vesículas, una de la membrana citoplasmática, otra proteína transmembranal de la membrana interna y otra de la membrana externa, LipL31, ImpL63 y LipL48 respectivamente (Haake and Matsunaga, 2002).

El estudio de la superficie de *Leptospira* (surfaceoma y glicoproteoma), por técnicas como geles de doble dimensión y espectrofotometría de masas por MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight), ayudan a encontrar otras proteínas no identificadas como la proteína transmembranal Q8F8Q0 o las proteínas de 20 kDa y 55 kDa de la superficie. Se ha

analizado el genoma de *Leptospira* y se han encontrado genes de glicolización, el glicoproteoma de *Leptospira* reveló la presencia de varias proteínas glicosiladas, que anteriormente se consideraban presentes sólo en células eucariotas y están relacionadas, con colonización, adherencia e invasión. Una de las ventajas en los estudios del surfaceoma y glicoproteoma, es la utilización de cantidades menores de 10^7 células, para el análisis de la superficie y su expresión durante la infección. Sin embargo, hay que realizar estudios bajo distintas condiciones, como presencia de suero, orina y temperatura. Los análisis de la superficie de *Leptospira* son otros métodos que ayudarán a encontrar candidatos potenciales, para el desarrollo de vacunas y técnicas diagnósticas (Cullen *et al.*, 2005^a; Cullen *et al.*, 2005^b).

Se ha estudiado la evolución molecular de ARN y PME en 38 serovariedades de leptospiros patógenas de las especies *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. wolbachii*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai* y *L. weillii*. Se analizaron los genes que codifican para: 16S ARNr, LipL32, LipL41 y OmpL1. Se observó que los genes *rrs* (16S ARNr) y *lipL32* son los más conservados; los *lipL41* y *ompL1* son más variables y el primero *rrs* es el más conservado. Los árboles filogenéticos desarrollados con base en los genes *rrs*, *lipL32* y *lipL41* fueron relativamente estables entre sí (Haake *et al.*, 2004). El *ompL1* tiene una composición de mosaico y está presente en 20.0% (8/38) de las serovariedades estudiadas de *Leptospira* (Hardjo, Lai, Bataviae, Mini, Canicola, Kremastos, Nicaragua y Galtoni). Los resultados de los análisis para establecer una relación filogenética entre serovariedades, con base en OmpL1, revelaron que dos segmentos que codifican para estructuras proteicas expuestas en la superficie de la proteína se adquirieron, probablemente, por una migración alélica horizontal de un ancestro desconocido (Haake *et al.*, 2004; Haake and Matsunaga, 2005)

Finalmente, se ha mencionado que la mejor manera de aproximarse a la caracterización del proteoma de *Leptospira*, es obteniendo aislamientos de *Leptospira* durante la fase aguda o letal de la infección (Nally *et al.*, 2005).

2.7 Mecanismos de patogenicidad y virulencia

Los mecanismos por los cuales el género *Leptospira* causa enfermedad, no están bien entendidos. Hay varios factores que se han sugerido estar asociados con virulencia, pero son pocos los que se han esclarecido (Levett, 2001). Evidentemente, las PME y el LPS juegan un papel importante en el establecimiento y desarrollo de la enfermedad (Adler and de la Peña-Moctezuma, 2004), el papel que desarrollan el LPS y las PME se ha descrito en párrafos anteriores.

Se ha investigado el efecto que tienen las leptospiras sobre procesos biológicos de defensa, donde se sabe que los leucocitos polimorfonucleares (PMN) no son eficientes para fagocitar leptospiras patógenas, donde hay adhesión pero no ingestión (Wang *et al.*, 1984^a). La defensa por monocitos y macrófagos, por medio de opsonización, debe estar mediada por anticuerpos específicos para la destrucción de leptospiras patógenas (Wang *et al.*, 1984^b). Células de la microglia, son consideradas como la línea de defensa celular en sistema nervioso ante cualquier patógeno, se ha observado que estas células tienen una escasa actividad fagocítica aunque existe adherencia, se cree que estimula la secreción de mediadores proinflamatorios (Cinco *et al.*, 2005). Con relación a otras moléculas de la superficie de *Leptospira*, se ha reportado que el peptidoglicano induce a la adherencia de PMN a células del endotelio (Dobrina *et al.*, 1995), además genera apoptosis en macrófagos (Mèrien *et al.*, 1997). Por otro lado, las glicoproteínas (GLP) tienen capacidad de inducir activación de monocitos en sangre periférica (Diament *et al.*, 2002).

Se realizaron varios trabajos sobre los efectos hemolíticos que producen las leptospiras patógenas. En *L. interrogans* serovariedad Hardjo (Hardjoprajitno) se seleccionaron genes codificantes de esfingomielinasas, los cuales se clonaron y expresaron en sistemas heterólogos para comprobar hemólisis; la esfingomielina es uno de los mayores componentes (>50%) de la membrana de los eritrocitos en bovinos (del Real *et al.*, 1989). En estudios posteriores se encontraron que esta hemolisina (esfingomielinasa C) es termoestable, pesa 63.2 kDa y tiene un alto grado de similitud con la β -toxina producida por *Staphylococcus aureus*, además de otras

producidas por *B. cereus* (Segers *et al.*, 1990). Se han descrito otras hemolisinas en *L. interrogans*, como SphH que posee actividad citotóxica y ésta tiene la capacidad de formar poros en células de mamíferos y no actúa como la esfingomielinasa C ni como fosfolipasa. La actividad citotóxica y hemolítica de esta enzima puede ser neutralizada por sueros hiperinmunes (Lee *et al.*, 2002).

Recientemente, con el acceso a los genomas de serovariedad Lai de *L. interrogans* (Zhang *et al.*, 2005), se realizó un análisis *in silico* de todos los genes potenciales que codifican para hemolisinas, con la finalidad de clonarlos y expresarlos en sistemas heterólogos. Se encontraron ocho candidatos divididos en esfingomielinasas y no esfingomielinasas. El gen *hlyX* se ha relacionado con LipL32 y su efecto hemolítico en *L. interrogans* serovariedad Copenhageni (Hauk *et al.*, 2005).

Dentro de la interacción del microorganismo con el hospedador, se ha descrito que, las GLP de *L. interrogans*, compuestas por ácido oleico y palmitoleico, tienen efecto sobre la inhibición de enzimas y disminuyen el transporte de iones fundamentales para los mamíferos (Na^+ , K^+ y ATPasa). Además, se ha demostrado que las GLP son tóxicas para cultivos de fibroblastos, esto sugiere que la liberación de estos ácidos grasos juegan un papel fundamental en la colonización de tejidos (Burth *et al.*, 1997). Se ha sugerido que la fagocitosis requiere receptores, porque en ensayos de infección en células Vero, muestran que la endocitosis puede ser inhibida por la monodansicadaverina (Mèrien *et al.*, 1997).

Se utilizaron paneles con extractos de sustancias extracelulares o intercelulares (colágeno, fibronectina y laminina) con la finalidad de determinar adherencia a componentes estructurales celulares; se determinó que las leptospiras patógenas muestran mayor adherencia a la fibronectina y en menor grado al colágeno y laminina (Patarakul *et al.*, 2005). La quimiotaxis y la motilidad son factores de virulencia importantes en leptospiras patógenas y son un factor importante en la adherencia a las células y tejidos. En relación con la quimiotaxis, se encontraron genes como *cheW* y *cheY* que están asociados a este fenómeno (Charon and Goldstern, 2002; Li *et al.*, 2005).

La supervivencia del microorganismo es un factor importante como mecanismo de transmisión e infección. Se han realizado ensayos de viabilidad en distintas condiciones de agua, donde se utilizó simplemente agua destilada y agua destilada más agar (0.5%), se apreció que la viabilidad de *Leptospira* fue mayor en el medio con agar (347 días), en comparación al agua destilada (110 días) (Trueba *et al.*, 2004). Estos datos muestran que, las leptospiras tienen un efecto de agregación en medios viscosos, efecto que también se ha observado en vida libre. El efecto de agregación celular le resulta protector contra antibióticos (tetraciclinas-penicilinas) y no parece afectarle la carencia de nutrimentos, a este fenómeno se ha relacionado la lipoproteína LipL31 (Trueba *et al.*, 2004). Por otro lado, se observó mayor viabilidad (98 días) en medios libres de sales (solución tamponada), en comparación con medios adicionados con sales (21 días). Además, al comparar extractos de membrana externa de las leptospiras cultivadas en agua con las cultivadas en medio EMJH, se apreció una proteína de 54 kDa identificada como GroEL, lo cual resulta interesante porque a esta proteína se le ha identificado y considerado parte del citosol (Trueba *et al.*, 2004). Las investigaciones sobre la viabilidad de *Leptospira* resultan ser interesantes, ya que se sabe poco de la capacidad de adaptación a la carencia de nutrientes, baja osmolaridad y presencia de otros microorganismos. Para este caso, se han realizado ensayos de viabilidad *in vitro*, donde se cultivó *L. interrogans* serovariedad Canicola en medio EMJH y posteriormente se recuperaron los microorganismos y se sembraron en agua destilada, solución salina fosfatada y agua de lluvia (estériles, pH 7.2). Los resultados revelaron que *Leptospira*, tiene gran capacidad de adaptación a medios carentes de nutrientes y baja osmolaridad, debido a la viabilidad y crecimiento exitoso observado al ser cultivada en agua destilada y agua de lluvia (Trueba *et al.*, 2002).

Además, en *Leptospira interrogans* serovariedad Lai, hay evidencia de la presencia del locus *chp* (*chpK* y *chpI*), también llamado locus *vapBC*, genes codificantes para un sistema de toxina-antitoxina asociado a procesos de autorregulación bacteriana estimulados por el ambiente,

donde la fisiología bacteriana responde al estrés nutricional regulando la síntesis de macromoléculas (Picardeau *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2004).

2.8 Inmunidad

La inmunidad contra la leptospirosis se establece en etapas tempranas de la infección o reinfección. Los linfocitos B constituyen la primera respuesta y producen anticuerpos específicos contra la serovariedad expuesta, éstos son anticuerpos de tipo IgM y en menor cantidad IgG y básicamente están dirigidos contra el LPS de *Leptospira* (Isogai *et al.*, 1990; Jost *et al.*, 1998; Faine *et al.*, 1999).

La inmunización en humanos es difícil, porque la mayoría de las bacterinas actualmente en uso produce, por un lado, reacciones adversas graves debido a que los biológicos se obtienen de medios ricos en proteínas de origen animal (albúmina sérica bovina y suero de conejo) y por otro lado, a la dificultad en desarrollar medios adecuados sin proteína animal para el cultivo de *Leptospira* (Faine *et al.*, 1999). Otra de las desventajas es que, la vacunación no evita la infección por otras serovariedades, lo cual significa desarrollar vacunas polivalentes (Cabezas *et al.*, 2005). Sin embargo, en algunos países como China, Cuba y Rusia se ha reportado la vacunación en humanos sin reacciones adversas con una protección adecuada (Acha y Szyfres, 2001; Bharti *et al.*, 2003; Koizumi and Watanabe, 2005).

Por otro lado, los biológicos aplicados a animales han sido usados ampliamente a pesar de algunas desventajas, como la baja actividad biológica para desarrollar una inmunidad adecuada (Faine *et al.*, 1999). Estudios en perros han demostrado que éstos se infectan y tienen signos clínicos, a pesar de ser vacunados (Gavaldón-Rosas *et al.*, 2005). Por lo tanto, la implementación de un programa de vacunación en perros sólo disminuyen la prevalencia y en algunos casos reducen la gravedad de los signos clínicos (Luna-Álvarez *et al.*, 2004). En animales de producción, como ganado porcino, las estrategias de vacunación deben basarse en datos seroepidemiológicos

de la región (Moles-Cervantes, 2004). Para ganado bovino, generalmente las vacunas no son efectivas para la prevención de la enfermedad (Ellis, 2004).

La investigación en el desarrollo de inmunógenos sigue enfocándose en estandarizar la extracción de antígenos; buscar nuevos candidatos como antígenos (proteínas); estandarizar la masa y dosis antigénica; estandarizar tipos y concentraciones de adyuvantes utilizados en las vacunas (Bidhendi *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2005; Gavaldón-Rosas *et al.*, 2005; Klaasen *et al.*, 2005).

La similitud y conservación de proteínas superficiales entre las serovariedades patógenas de *Leptospira*, es una posibilidad para el desarrollo de antígenos que confieran inmunidad cruzada. Se evaluó la capacidad inmunoprotectora de OmpL1 y LipL41 en hámster sirio dorado, como modelo de estudio. Usando estrategias de expresión en sistemas heterólogos (*E. coli*), los hámsteres fueron inmunizados con fracciones de la membrana de *E. coli* que tenían las proteínas recombinantes de *Leptospira*. Al ser desafiados con una cepa virulenta de bajo pasaje (*L. kirschneri*, serovariedad Grippytyphosa), se observó un 71.0% de protección después del desafío, además no se apreció evidencia de infección por medio de serología, histología y aislamiento. Los estudios revelaron que la combinación de estas proteínas, usadas como antígenos, ofrecieron sinergismo y resultaron ser una alternativa para generar protección inmunológica cruzada (Haake *et al.*, 1999).

Con la finalidad de utilizar proteínas recombinantes se han diseñado vectores con ADN de adenovirus para la expresión de una hemolisina (31 kDa Hap1), OmpL1, o ambas. Al desafiar jerbos con *L. interrogans* serovariedad Canicola, se observó que la mayor protección fue obtenida con adenovirus-Hap1 y la combinación adenovirus-Hap1 + adenovirus-OmpL1, produciendo una protección del 87.0% (26/30) y del 75.8% (22/29), respectivamente (Branger *et al.*, 2001). Actualmente, se exploran otras estrategias de protección contra la leptospirosis, diferentes al uso PME.

Se han desarrollado anticuerpos monoclonales (IgG2b), dirigidos contra la proteína flagelar FlaB, que muestran reactividad cruzada contra 15 serovariedades de *L. interrogans*

y no contra apatógenas, lo cual sugiere que estos anticuerpos pueden ser protectores ante la infección (Artornurasook *et al.*, 2005).

Ensayos realizados en células Vero, han demostrado que el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra una proteína de 36 kDa, ofrecen reactividad cruzada con propiedades neutralizantes, contra las serovariedades Autumnalis, Bataviae y Pyrogenes (Gaudart *et al.*, 2005).

Estudios comparativos han demostrado que la inmunidad humoral no es suficiente ya que, es necesaria la respuesta inmune celular para prevenir infección contra serovariedades de *Leptospira* (Hardjo) en ganado lechero (Brown *et al.*, 2003). En contraste, una bacterina monovalente conteniendo una cepa de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjobovis) indujo protección del 100% (8/8) contra la infección al desafiar con una cepa virulenta de Hardjo (Bolin and Alt, 2001). Estudios de vacunación y desafío posteriores, mostraron que la inmunidad esta relacionada con la respuesta inmune celular (Linfocitos T) (Naiman *et al.*, 2002). Aunque la inmunidad humoral es considerada como la protección dominante en las infecciones por leptospirosis, es importante investigar sobre la inmunidad celular para el desarrollo de vacunas o bacterinas efectivas contra la leptospirosis (Koizumi and Watanabe, 2005).

2.9 Leptospirosis

2.9.1 Manifestaciones clínicas

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la leptospirosis como una enfermedad infecciosa y contagiosa multi-sistémica de mamíferos domésticos y silvestres; principalmente bovinos, perros y cerdos, que cursa principalmente con signos asociados a daño de tipo reproductivo, hepático y renal, causados por serovariedades patógenas de *Leptospira*. La leptospirosis puede afectar a los humanos, que han tenido contacto con la orina o los tejidos de animales infectados o con líquidos contaminados, debido a sus ocupaciones o bien tras desastres

naturales, en quienes se presenta como una enfermedad febril aguda asociada con ictericia, hemorragias, mialgias, conjuntivitis y/o meningitis (World Health Organization, 2003).

El cuadro de leptospirosis en humanos se caracteriza por presentar: afección respiratoria con o sin hemoptisis, anemia hemolítica, anuria, azotemia, cefalalgia, confusión y depresión psicológica, constipación, desequilibrio electrolítico, diarrea, escalofríos, exantema en paladar, fiebre, hemorragias del tracto gastrointestinal, hemorragias en piel y mucosas, hepatomegalia, ictericia, insuficiencia hepatorenal, meningitis, mialgia, miocarditis, náuseas, oliguria, proteinuria, sufusión de las conjuntivas y vómito (Acha y Szyfres, 2001; Chin, 2001). Los signos son tan variados que se confunde frecuentemente con otras enfermedades, por ejemplo Dengue hemorrágico en países tropicales (Chin, 2001; Granito *et al.*, 2004).

En animales los cuadros clínicos de la enfermedad también son variados (Faine *et al.*, 1999). En ganado bovino puede estar presente sin signos clínicos o puede haber abortos, anorexia, baja de la producción láctea, conjuntivitis, diarrea, fiebre, hemoglobinuria, ictericia e infertilidad (Quinn *et al.*, 1994; Acha y Szyfres, 2001). Hay datos que sugieren que focos macroscópicos de nefritis intersticial crónica (manchas blancas en riñones) podrían ser causados por leptospirosis (Uzala *et al.*, 2002). En ganado porcino se pueden observar falla reproductiva caracterizada por abortos, infertilidad, anorexia, convulsiones o signos nerviosos, fiebre, hemoglobinuria, ictericia, infertilidad, lechones nacidos débiles, mastitis, meningitis y trastornos gastrointestinales, o simplemente estar en forma subclínica (Faine *et al.*, 1999; Acha y Szyfres, 2001; Moles-Cervantes, 2004). En perros se reconocen tres síndromes asociados a leptospirosis: agudo hemorrágico, urémico (enfermedad de Stuttgart) y crónico icterico (Quinn *et al.*, 1994; Luna-Álvarez *et al.*, 2004). La leptospirosis puede cursar con fiebre, hemorragias en mucosas (cuadro hemorrágico agudo) y al tracto gastrointestinal, ictericia, mialgia, postración, rigidez, uremia, estomatitis, faringitis ulcerativa y vómito (Faine *et al.*, 1999; Acha y Szyfres, 2001; Luna-Álvarez *et al.*, 2004). En equinos pueden apreciarse abortos ocasionales, uveítis recurrente ó problemas oftálmicos; rara vez anorexia, depresión, fiebre e ictericia (Quinn *et al.*, 1994; López-Pérez *et al.*, 1998; Acha y

Szyfres, 2001). En ganado caprino y ovino suele estar en forma subclínica y ocasionalmente pueden presentarse abortos, anemia, depresión, disnea, hemoglobinuria, ictericia y mortalidad de corderos (Quinn *et al.*, 1994; Faine *et al.*, 1999; Acha y Szyfres, 2001). Los roedores y muchos animales de vida silvestre, están adaptados a las leptospiras y no manifiestan signos o lesiones.

2.9.2 Epidemiología

En la triada epidemiológica (Figura 1) la humedad es un factor fundamental. Para que la infección ocurra se requiere del contacto con cualquier medio líquido contaminado con leptospiras patógenas, como agua u orina (Faine *et al.*, 1999; Acha y Szyfres, 2001). Existen reportes de infecciones por *Leptospira* en personas que practican deportes extremos o por nadar en albercas, ríos o lagos contaminados (Levett, 2001; Haake *et al.*, 2002).

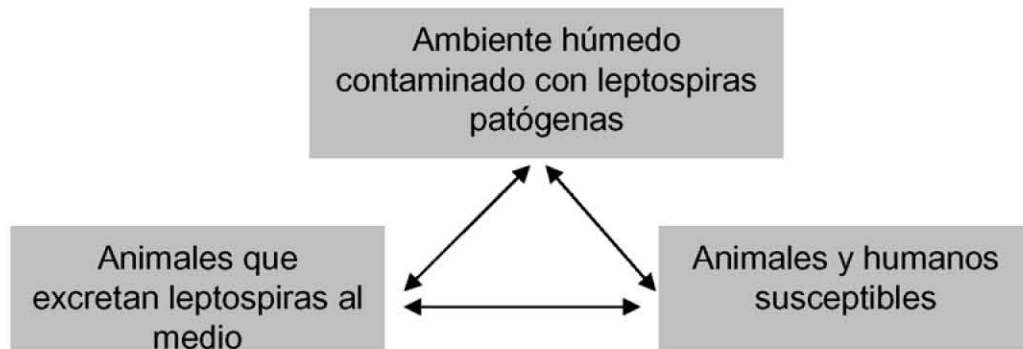


Figura 1. Triada epidemiológica de la leptospirosis.

Las personas que se consideran en riesgo potencial son aquellas que están expuestas a la orina de animales infectados excretadores y aquellas que viven en ambientes bajo condiciones de alta humedad y alto índice de animales enfermos, portadores asintomáticos o reservorios (Bharti *et al.*, 2003; Heuer *et al.*, 2005). Como reservorios, se entiende aquellos animales que alojan serovariedades patógenas de *Leptospira* pero sin manifestaciones clínicas, como es el caso de los roedores (Acha y Szyfres, 2001; Levett, 2001).

2.9.3 Control y tratamiento

Para evitar la leptospirosis, la prevención como medida temprana de control se enfoca a controlar principalmente roedores que contaminen el hábitat de los humanos y animales, además de otros animales excretores o portadores de *Leptospira* y animales de vida silvestre, lo cual resulta prácticamente imposible (Acha y Szyfres, 2001; Koizumi *et al.*, 2005; Meeyam *et al.*, 2005).

La quimioterapia contra la leptospirosis es muy similar en todas las especies animales, el microorganismo es sensible a los β lactámicos, tetraciclinas y aminoglucósidos. Así, el tratamiento con uno o dos distintos antibióticos simultáneamente es posible, como: amoxicilina, dehidroestreptomicina, doxiciclina, estreptomicina, oxitetraciclinas, penicilina G y tetraciclinas (Faine *et al.*, 1999; Acha y Szyfres, 2001). En humanos se recomienda amoxicilina, ampicilina y/o doxiciclina (Chin, 2001; Niwattayakul *et al.*, 2005).

2.9.4 Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de la leptospirosis, tanto en el hombre como en animales es difícil y complejo. Por un lado, las manifestaciones clínicas son muy variadas; así que, la enfermedad es confundida con muchas otras entidades tanto infecciosas como hepatitis, dengue, fiebre amarilla, brucelosis y otras septicemias; trastornos inmunológicos como lupus eritematoso, fiebre reumática, uveítis autoinmune (Levett, 2001, Bajani *et al.*, 2003; Ellis *et al.*, 2005; Hartskeerl *et al.*, 2005). Por otro lado, aun en la sospecha de leptospirosis, la confirmación de laboratorio se ve en dificultades debido a que *Leptospira* es un organismo muy frágil y de muy lento desarrollo en condiciones de laboratorio. Por este motivo, métodos diagnósticos como detección de anticuerpos, microscopia directa en campo oscuro, con tinciones o detección mediante inmunohistoquímica o hibridación de ADN; o detección de ácidos nucleicos del microorganismo usando PCR, son utilizados para confirmar un diagnóstico (Myers *et al.*, 1985; Quinn *et al.*, 1994; Bajani *et al.*, 2003; Levett, 2005).

El diagnóstico de la leptospirosis se basa principalmente en la respuesta inmune generada por individuos convalecientes o expuestos a la bacteria. La prueba de referencia mundial para el diagnóstico de la leptospirosis en animales y en humanos es la aglutinación microscópica (AM) (Bharti *et al.*, 2003; World Health Organization, 2003). Esta prueba inmunológica consiste en enfrentar diluciones de suero de pacientes con sospecha de leptospirosis contra diferentes cepas de leptospiras viables y observar el grado de aglutinación en las diferentes diluciones bajo el microscopio de campo oscuro (CO). Esta prueba ofrece la ventaja de ser cuantitativa y cualitativa (Cole *et al.*, 1973; Myers, 1985; Cumberland *et al.*, 1999). Hay métodos de diagnóstico alternativos (PCR, PCR en tiempo real y pruebas serológicas con proteínas y LPS) que se han sugerido como candidatos para diagnóstico de leptospirosis, sin embargo no han sido validadas apropiadamente (Hartskeerl, 2005; Levett, 2005).

2.10 Genoma de *Leptospira*

El género *Leptospira* tiene dos cromosomas circulares (CI y CII) y no se ha reportado aun que estas bacterias tengan plásmidos. El porcentaje de Guanina – Citosina (G-C) varía según la especie, en términos generales podemos decir que las leptospiras patógenas tienen 38.3% de G-C, las especies aun no asignadas tienen un porcentaje de 40.0% y las especies saprófitas tienen 35.0% de G-C. Comparado con otros géneros de la Familia *Spirochaetaceae*, como *Borrelia* cuyo porcentaje G-C es mayor (46.0%) al igual que *Leptonema* (54.0%) o bien enterobacterias como *E. coli* (48-52.0%), podemos decir que *Leptospira* tiene un porcentaje G-C relativamente bajo (Faine *et al.*, 1999; Adler and de la Peña-Moctezuma, 2004; Madigan *et al.*, 2004). En el Cuadro 4 se enlistan las especies del género *Leptospira* y su porcentaje individual de G-C.

A la fecha, se han publicado las secuencias completas de dos genomas del género *Leptospira*, uno de la serovariedad Lai y otro de la serovariedad Copenhageni, ambos de la especie *L. interrogans* (Ren *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 2004). En Lai el tamaño del

cromosoma I (CI) es de 4,332,241 pb y el tamaño del cromosoma II (CII) es de 358,943 pb, sumado en conjunto los dos cromosomas, el genoma completo es de 4,691,184 pb. El tamaño de los cromosomas de Copenhageni es de 4,277,185 pb para CI y para CII es de 350,185 pb, el tamaño del genoma completo es de 4,627,366 pb.

Cuadro 4. Especies del género *Leptospira* y sus porcentajes guanina- citosina (G-C)

Especies patógenas	Porcentaje de G-C
<i>L. alexanderi</i>	38.0
<i>L. borgpetersenii</i>	39-39.8
<i>L. interrogans</i>	34.9
<i>L. kirschneri</i>	ND
<i>L. noguchii</i>	36.5
<i>L. santarosai</i>	40.5
<i>L. weillii</i>	40.5
Geno-especies sin nombre	
Geno-especie 1	39.8
Geno-especie 3	43.4
Geno-especie 4	38.9
Geno-especie 5	37.9
Especies patogenicidad incierta	
<i>L. fainei</i>	ND
<i>L. inadai</i>	42.6
Especies saprófitas	
<i>L. biflexa</i>	33.5
<i>L. meyeri</i>	35.2
<i>L. wolbachii</i>	37.2

ND= Porcentaje no determinado (Faine *et al.*, 1999; Adler and de la Peña-Moctezuma, 2004)

El genoma de la serovariedad Lai es 63,818 pb más grande que el de Copenhageni. El porcentaje de G-C es de 35.1% para CI y de 35.0% para CII en Copenhageni; ligeramente menor que el de Lai, que es de 36.0% para CI y de 36.1% para CII, lo que representa 1.0% mayor que en Copenhageni. El número de genes entre las dos serovariedades varía, por ejemplo, el número de genes que codifican para proteínas con función asignada es de 1,972 genes (1,811 en CI y 161 en CII) en Copenhageni y para Lai es de 2,060 genes (1,901 en CI y 159 en CII), una diferencia de 88 genes más en Lai. Genes conservados o hipotéticos, Copenhageni tiene 1,746 genes (1,643 en CI y 113 en CII) y en Lai tiene 2,667 genes (2,459 en CI y 208 en CII), una diferencia 921 genes más

que Copenhageni. En las dos serovariedades hay 37 genes para ARN de transferencia y en ambas serovariedades se encuentran en el CI. Todos los genes de ARN ribosomal (dos genes de 23S y 16S; uno de 5S) se encuentran en el CI, sin embargo Lai tiene un gen menos de ARNr 23S. En cuanto a secuencias de inserción (SI), Copenhageni tiene 26 en CI y ninguna en CII, Lai tiene 48 en CI y además hay 9 en CII, 31 IS más en Lai que en Copenhageni. Entre las dos serovariedades hay diferencias únicas, hay genes (específicos o copias extras) que son \geq a 180 pb, los cuales son únicos en una u otra serovariedad, varios de estos genes se localizan en una región de 54 kb en serovariedad Lai, región que no se encuentra en Copenhageni.

Por la predicción de genes y su probable función en la patogénesis de la bacteria, se describen los siguientes que están en ambas serovariedades: Hay 23 genes asociados a la biosíntesis del LPS y 79 genes asociados a quimiotaxis y motilidad.

Dentro de los genes relacionados con proteínas de adhesión y/o proteínas de superficie hay seis proteínas adhesinas fimbriales, de las cuales tres (*ligA*, *ligB* y *ligC*) son proteínas con dominio parecido a las inmunoglobulinas bacterianas y tres genes (LIC12259, LIC10021 y LIC13101) que codifican para proteínas con dominios FG-GAP (fenilalanina-glicina y glicina-alanina-prolina) similares a las proteínas integrinas α , relacionadas con la unión a moléculas (matriz extra celular y migración de linfocitos). Se identificaron nueve genes relacionados con proteínas similares a hemoaglutininas, 184 lipoproteínas y 33 proteínas relacionadas con polisacárido capsular o exopolisacáridos. Respecto a los genes relacionados con proteínas con función de degradación de la membrana celular de hospederos, hay cinco homolisinas del tipo de las esfingomielininas; una fosfolipasa D ortóloga y una hemolisina formadora de poros (*tyLABC*). Dentro de las proteasas hay una colagenasa, una metaloproteasa y una termolisina. Además tiene 12 genes que codifican para una proteína similar a ankyrina (proteína asociada al citoesqueleto de eritrocitos) y ocho genes asociados a resistencia del estrés oxidativo (Ren *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 2004^a; Nascimento *et al.*, 2004^b).

2.11 Bacteriófagos y herramientas moleculares

El potencial de las herramientas moleculares para el análisis de la genética de *Leptospira* comienza con el aislamiento del primer bacteriófago o leptofago (el único hasta la fecha), por I. Saint Girons y colaboradores en 1990 (Saint Girons *et al.*, 1990), quienes reportaron tres bacteriófagos en *Leptospira biflexa*, aislados a partir de aguas residuales en Paris, Francia.

Los fagos no infectan cepas de especies patógenas de *Leptospira* y su rango sólo se limita a infectar la serovariedad Patoc de *L. biflexa*. Estos fagos infectan a esta serovariedad produciendo un ciclo lítico, pero no entran en un estado lisogénico. Por medio de microscopía electrónica, se observó que estos fagos tienen cabezas poliédricas y una cola contráctil. El genoma de estos fagos es sensible a enzimas de restricción y consiste en una doble cadena de ADN. Al linearizar el ADN de estos bacteriófagos, por electroforesis de campos pulsados, se observó que su genoma mide 60 kb para el fago denominado LE1 y 50 kb para los fagos denominados LE3 y LE4. La secuencia del genoma del leptofago, que tiene un tamaño de 74 kb y esta constituido por 79 MAL, con un porcentaje G-C de 36%, similar al genoma de *Leptospira* (Bourhy *et al.*, 2005).

Diez años más tarde del hallazgo del leptofago, se reportó la construcción de un vector de transición (“Shuttle”) para *L. biflexa* y *E. coli* (Saint Girons *et al.*, 2000). Este vector se construyó con el promotor derivado del fago LE1, se tomaron fragmentos al azar del ADN de este fago y fueron clonados adentro del plásmido pGEM¹, que originalmente contenía el gene *bla* (β -lactamasa) y fue remplazado por un marcador de resistencia a kanamicina proveniente de *Enterococcus faecalis* (Saint Girons *et al.*, 2000). De esta manera, se diseñaron dos vectores de transición pGKLep1 y pGKLep4. Esta construcción fue transformada en *L. biflexa* serovariedad Patoc 1 por medio de electroporación, confiriendo a esta serovariedad transformada, la resistencia a kanamicina. Estas han sido las herramientas genéticas básicas para *Leptospira*, las cuales son escasas y no existían anteriormente para el género (Saint Girons *et al.*, 1990; Saint Girons *et al.*, 2000; Zuerner *et al.*, 2000). A partir de estas herramientas, algunas mutantes han sido generadas

¹ Promega, EUA.

en *L. biflexa* entre otras, *flaB*, *trepE*, *metW* y *metY*, *fecA* y *feoB* (Picardeau *et al.*, 2001; Picardeau *et al.*, 2003; Louvel *et al.*, 2005). Más recientemente, el transposón mariner (*Himar1*) ha sido utilizado para generar mutantes aleatorias en cepas patógenas de *Leptospira* (Bourhy *et al.*, 2005). En la Figura 2 se muestra una de las construcciones mencionadas.

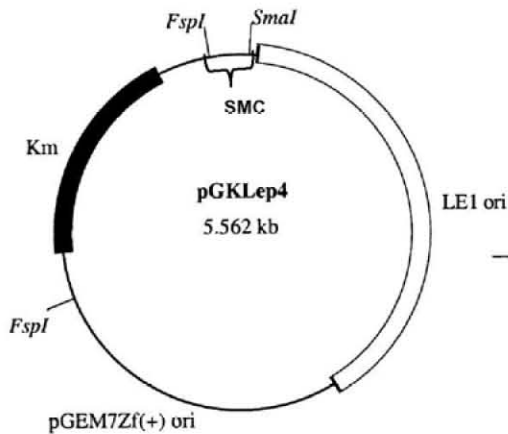


Figura 2. Vector pGKLep4 desarrollado con el origen de replicación del leptofago LE1 y un cassette de resistencia a kanamicina en el vector pGEM7Zf (+) ori (Saint Girons *et al.*, 2000)

2.12 Sistema de Secreción Tipo II (SST-II)

Proteínas de la membrana externa (PME), han llamado la atención como una alternativa inmunogénica para la prevención de la leptospirosis. Se ha hecho mención de los estudios que se han realizado con PME. Entre estas, llama la atención aquellas PME funcionales. El SST-II es la principal vía de secreción proteica en bacterias Gram negativas, su secretina GspD se encuentra localizada sobre la membrana externa. Dada su importancia, en este apartado nos referiremos al SST-II. La nomenclatura de los componentes proteicos incluye las siglas GSP (general secretion pathway), nomenclatura asignada a los genes que codifican para proteínas de este sistema. Sin embargo, en varias de las bacterias donde se ha reportado el SST-II, los genes asociados se pueden encontrar con otra nomenclatura, por ejemplo: *Aeromonas hydrophila*, *tap*; *E. coli*, *etp*; *Klebsiella oxitoca*, *pul*; *Legionella pneumophila*, *pil* ó *lsp*; *Pseudomonas aeruginosa* y *Ps. putida*, *xcp*;

Vibrio cholera, *etp*, *eps* ó *vcp*; *Xanthomonas campestris*, *xsp* (Thanassi and Hultgren 2000; Lee and Schneewind, 2001; Sandkvist, 2001^a).

El SST-II es responsable de secretar proteínas, tales como enzimas hidrolíticas y toxinas. Entre las enzimas que se han reportado ser secretadas por este sistema, varias se han relacionado con el proceso de patogenicidad bacteriana, entre ellas se encuentran las siguientes: acidofosfatasa, ADNasa, aerolisinas, amilasas, ARNasa, elastasas, exotoxina A, fosfolipasa A, fosfolipasa C, lipasa C, lisofosfolipasa A, neuroaminidasas, proteasas-hemoagltininas, pululanasa, quitinasas, toxina LT de *E. coli* y *V. cholera* (Sandkvist, 2001^a; Tauschek *et al.*, 2002; Rossier *et al.*, 2004). Además, el SST-II se ha relacionado con la biogénesis de la membrana externa y la cápsula (Francetic *et al.*, 2000).

Las vías de secreción bacterianas se han clasificado en SST-I, SST-II, SST-III, SST-IV y autotransportadores o SST-V, esta clasificación se basa en el tipo de mecanismo molecular que utilizan. Sin embargo, entre éstos existe una subdivisión que los clasifica en dos, los sistemas de secreción Sec-dependientes y los Sec-independientes. La diferencia entre la vía Sec-dependiente y la Sec-independiente, es que la primera necesita de un péptido señal o secuencia líder que se une a un complejo de proteínas situadas en la membrana interna, que sirven para translocar la proteína inmadura del citosol al espacio periplásmico. Este complejo protéico se le conoce como sistema Sec (Lee and Schneewind, 2001). La vía Sec-independiente puede translocar la proteína desde el citosol hasta el exterior de la célula, sin ningún intermediario periplásmico ni secuencia líder (Thanassi and Hultgren, 2000; Lee and Schneewind, 2001). La secreción de proteínas por el SST-II (Sec dependiente), se inicia con el transporte de precursores monoméricos con un péptido señal, utilizando la vía Sec hacia el espacio periplásmico por medio de un poro, este poro está compuesto por tres proteínas denominadas SecY, E y G. La proteína precursora (con el péptido señal), se une a la proteína chaperona SecB, quien la dirige a la subunidad SecA situada en membrana interna (MI) con el complejo de translocación SecYEG. La proteína SecA es una ATPasa cuya actividad de hidrólisis provee de la energía necesaria para la exportación de la proteína hacia el periplasma.

Una vez que los polipéptidos se translocan, actúa una peptidasa que procesa el péptido líder, para finalmente liberar a la proteína en el espacio periplásmico. La energía de la hidrólisis de ATP se utiliza para la transferencia de la preproteína de SecA hacia SecYEG, una vez que esto sucede, la translocación puede ser dirigida por la fuerza protón motriz (Driessen *et al.*, 2001).

El transporte del producto extracelular translocado en el espacio periplásmico a través de la membrana externa (ME), se lleva a cabo por 12 a 17 proteínas, que conforman el llamado SST-II (Thanassi and Hultgren, 2000; Sandkvist, 2001^b; Nascimento *et al.*, 2004). En el periplasma, las proteínas a exportar cambian su estructura por medio de la formación de puentes disulfuro o la oligomerización y adquieren su conformación nativa. El SST-II incluye dos componentes sobre la ME expuestos al exterior, las proteínas GspD y GspS. GspD pertenece a la familia de las secretinas y se inserta en la ME, por medio de su oligomerización formando un anillo dodecamérico (Lee and Schneewind, 2001). Cabe señalar, que la secretina GspD está conservada entre los SST-II de diferentes bacterias Gram negativas. Además, componentes similares son encontrados en el SST-III y en el proceso de polimerización del pili tipo IV de varias bacterias (Lory, 1998; Peabody *et al.*, 2003). Por otro lado, la proteína GspS es una lipoproteína de la ME que actúa como chaperona de GspD para su correcto plegamiento y actividad. Sin embargo, la mayoría de las proteínas de este sistema (GspB, C, F, G, H, I, J, K, L, M, N y O) se localizan en la MI o están en el periplasma asociadas a la MI (Lory, 1998). GspE es una ATPasa que energiza el proceso de polimerización de GspG, se localiza en la región citoplasmática e interactúa con la proteína GspL de la MI. Más aun, GspG funciona como un pistón expulsando la proteína madura hacia el exterior de la bacteria a través de la porina GspD (Lory, 1998; Sandkvist, 2001^a; Sankvist, 2001^b).

En el genoma de *Leptospira* (serovariedades Copenhageni y Lai), se encuentra el *locus* del SST-II (*gsp*) representado por *gspCDEFG* (*gspCDEFG* en Copenhageni y *epsGFEDC* para Lai) (Ren *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 2004^b). En las serovariedades Copenhageni y Lai el *loci* de *gsp* ésta

compuesto por 17 MAL,¹ a diferencia del *locus gsp* en *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjobovis), que está constituido por 14 MAL con un orden similar al de la serovariedad Copenhageni (*gspCDEFG*). Otra diferencia del *locus gsp* de la serovariedad Hardjobovis (*L. borgpetersenii*) con Copenhageni y Lai (*L. interrogans*) es que corriente abajo de *gspG* se encuentran 5 MAL que muestran identidades que corresponden a proteínas relacionadas con la biogénesis de pilinas (MAL6, MAL10 y MAL12), similares a los genes que constituyen el SST-IV (de la Peña-Moctezuma *et al.*, 2002). Además, se ha determinado antigenicidad para la proteína homóloga de GspD en *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjobovis) (de la Peña-Moctezuma *et al.*, 2002; Rodríguez-Reyes *et al.*, 2005).

¹ NCBI, NC 005823 y NC 004342.

3 HIPÓTESIS

La serovariedad Patoc de *Leptospira biflexa* posee genes homólogos a *gsp* que codifican para proteínas del sistema de secreción tipo II.

4 OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo fue la identificación, secuenciación y caracterización parcial de los genes *gspD_L* y *gspE_L* en *Leptospira biflexa* serovariedad Patoc.

5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

5.1 Detectar y secuenciar los genes *gspD_L* y *gspE_L* en *Leptospira biflexa* serovariedad Patoc, que codifican para la formación de una proteína (secretina) localizada en la membrana externa y una ATPasa de la membrana interna, respectivamente.

5.2. Comparar y analizar *in silico* las secuencias de los genes *gspD_L* y *gspE_L* de la serovariedad Patoc con las serovariedades patógenas Copenhageni, Hardjobovis y Lai, así como con otras secuencias homólogas en las bases de datos.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Cultivo de *Leptospira*

La cepa de *L. biflexa* serovariedad Patoc cepa Patoc I, proveniente del Instituto Pasteur de Paris (*Leptospira National Reference Center, Institut Pasteur, Paris, France*) y amablemente proporcionada por nuestro colaborador Prof. David A. Haake de la Universidad de California EUA (UCLA), fue cultivada en 100 ml de medio EMJH (Apéndice I) suplementado con 1.0% de fracción V de albúmina sérica bovina¹ e incubada² a 30° C durante 5 a 7 días, hasta que alcanzaron un grado de desarrollo de 0.5 de turbidez según el nefelómetro de MacFarland, equivalente a 10⁶ leptospiras/ml (Myers, 1985, Faine *et al.*, 1999).

6.2 Extracción de ADN genómico

El cultivo de *Leptospira* fue concentrado por centrifugación³ en tubos de 30 ml⁴, a una fuerza 16,000 x g durante 30 minutos (min) a 4° C. Se decantó el medio y el sedimento de leptospiras se resuspendió en 4.2 ml de buffer tris-etilen-dinitrilo-tetracetato disódico (TE, Tris-EDTA) y 222 µl de solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10.0% (Apéndice II), más 22.5 µl de Proteinasa K¹ (20 mg/ml). La suspensión de leptospiras se incubó a 37° C durante una h. Posteriormente, a la mezcla se le agregó 1 ml de solución de cloruro de sodio (NaCl) 5M más 680 µl de una solución de bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB)¹ al 10.0%, precalentado a 65° C (Apéndice II). Se mezcló todo e incubó a 65° C durante 20 min. Después de la incubación, toda la mezcla se transfirió a tubos nuevos⁵ (estériles) con capacidad de 1.5 ml y se adicionó en cantidades equivalentes cloroformo: alcohol isoamílico⁶ (24:1 v/v). Se mezcló y se centrifugó⁷ a una fuerza de

¹ Sigma Aldrich, EUA.

² Precision Scientific Co, Mod 4, EUA.

³ Centrifuga Beckman J2-21, EUA.

⁴ NalGen Nunc, EUA.

⁵ AxyGen Scientific, EUA.

⁶ JT-Baker, EUA.

⁷ Savant, Francia.

1,400 x g durante 5 min a 4° C. Después de la centrifugación, se separó el sobrenadante en un tubo nuevo y se repitió el mismo paso tres veces, hasta que el sobrenadante se apreció incoloro.

El sobrenadante fue mezclado con 0.6 volúmenes de 2-propanol¹ almacenado a 4° C y se centrifugó² a 15,000 x g durante cinco min a 4° C. Se decantó la solución y el sedimento se lavó tres veces con 2 ml de etanol¹ al 70.0% almacenado a -20° C. Finalmente, el sedimento se dejó secar a temperatura ambiente y una vez seco se solubilizó en 0.5 ml de agua desionizada estéril para su almacenamiento a 4° C hasta su uso (Ausubel *et al.*, 1993; de la Peña-Moctezuma, 2002).

Después de la extracción de ADN genómico, todas las alícuotas obtenidas fueron cuantificados para obtener su concentración para ensayos posteriores, la cuantificación fue realizada por medio de fluorometría.³ Además, se corroboraron las extracciones mediante geles de agarosa al 1.0% teñidos con una solución de bromuro de etidio (0.1 µg/ml) (Apéndice II) y expuesta a la luz ultravioleta (UV) para visualizar el ADN.

6.3 Purificación de ADN

Este método se realizó posterior a cualquier reacción enzimática (desfosforilación, digestiones ó ligazones) para librar el ADN de impurezas protéicas. Al volumen inicial, se adicionó un volumen de agua desionizada estéril c.b.p. 200 µl y un volumen similar de fenol equilibrado (Apéndice II); se mezcló y se centrifugó² a 14,926 x g durante cinco min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo⁴ y adicionó un volumen similar de cloroformo: alcohol isoamílico¹ (24:1); se mezcló y se centrifugó nuevamente a 15,000 x g durante cinco min y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo.

Para precipitar el ADN, al volumen recuperado, se adicionó 10.0% de solución de acetato de sodio 3M (Apéndice II) más 2.5 volúmenes de etanol al 100% almacenado a - 20 ° C. Se

¹ JT-Baker, EUA.

² Savant, Francia.

³ Hoefer, EUA.

⁴ AxyGen Scientific, EUA.

incubó de 12 a 16 h o toda la noche a -20°C , y posteriormente, se centrifugó nuevamente. El sedimento se lavó con 1 ml de etanol⁴ al 70.0% almacenado a -20°C y se centrifugó bajo las mismas condiciones, el precipitado obtenido se dejó secar a temperatura ambiente y una vez seco, se solubilizó en 20 a 35 μl de agua desionizada estéril y se almacenó a 4°C (Ausubel *et al.*, 1993).

6.4 Amplificación de genes del *loci gsp* en *L. biflexa* serovariedad Patoc

Para identificar los fragmentos del *loci gsp* en el genoma de la serovariedad Patoc, se diseñaron inicialmente iniciadores degenerados para la PCR. Se analizaron las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de *gspC*, *gspD* y de *gspE* (MAL3, 4 y 5), de las serovariedades Copenhageni, Lai y Hardjobovis de *Leptospira* para buscar regiones conservadas. La información de los genes y su codificación a proteína de serovariedad Copenhageni y Lai, fueron obtenidas del sitio electrónico del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con los números de acceso CN005823 y CN004342 respectivamente. Las secuencias de la serovariedad Hardjo fueron proporcionadas por el Prof. Ben Adler y el Dr. Dieter M. Bulach (proyecto genoma- Hardjobovis, en revisión) de la Universidad de Monash, Clayton, Victoria, Australia. Con base en la secuencia de aminoácidos de la serovariedad Lai, se encontró una zona conservada en *gspD*, para el diseño de iniciador degenerado adelantado BAP2357 y una zona conservada en *gspE* para el diseño del iniciador degenerado reverso BAP2358 (Cuadro 5). En la Figura 3 se muestra la secuencia de aminoácidos de GspD y GspE de la serovariedad Lai y las regiones conservadas donde fueron diseñados los iniciadores. Estos iniciadores amplifican mediante PCR un fragmento de 1.5 kb. Con la finalidad de complementar la secuencia obtenida, se inició en una estrategia de avance sobre el cromosoma (“*chromosome walking*”) como se describe más adelante.

Figura 3. Secuencias de aminoácidos de GspD_L y GspE_L de la serovariedad Lai

GspD_L

MYGTISQFSIFRIFPILILLFLVWDKPVFPQSKKKSSVKTRSATAPEEPAEKSFYANWRDTELNDF
 LKGMSAIILKKNILLDESLKGGKITIISQKEIPIKNAFIFMKSVLES LGFGVVEEPDLISIVKIKDA
 LARSPVVRVGKELIPETEVGDYRTITQIPIENTKPEELEPILKRLTSPNTDVIYRNTNTIVLSG
 SCADINKLLVLINELDLKLEEASPGAIASACDVHIYTLHSEAEKIAATLVKLDNPVVQSEELSPE
 KKVPGQIPMKVEKIKAVGHKESNSVIVTATNAEWAIEIRKIKVLD SARKQVLLLEVLIVELTSSDLN
 DFGIDWRYKGEAFGQFN SGLSKEANIINSNGQINPNVNTLSGFSLGFLKAGSEQIIGILSANQGNE
 NFNVLSAPQVLTVDNQEAIEISVGQDVPVRTQSRNAGTGGTNAVTVDNYEYRPTGIKLFKTPHVNKN
 NRITLLELFQEIKNIAEIALAGGNPTFNREIKTSSISENTQSIVIGGLISNDKQKRIKIPFLGDI
 PYLGHLFKRTTEKIKKTNLMVFITPHILDSRENADKMTVKKMLQEYELERERILNKEKEIKSFF
 RKRFD

GspE_L

MEEIFLQIPLKLIQKSRIVPFSLSKKTIRIAVSDPSDLHPMDARNFLKGYNVEFILAPEPEIMRIIHSFDN
 TSSAAKEMLNEMEGSFSELAEAFENETLDLSDDAPIIKMVNVLISQAVNERASDIHIEPYEKSLVVRVVDGI
 LHNVLSPPKSYHAGISSRIKIMSNLNIAENRLPQDGRIKRLLAGKDIDIRVSTIPCFGERIVMRLLNKTDQK
 YSLDTMGFPYELIQSLRSLIYEPHGIILVTGPTGSGKSTTLYSALSSELNTEERNIITCEDPVEYQIEGTSQM
 MQEKIGLTFATGLRAILRQDPDVIIMVGEIRDEETARIAIQASLTGHLVFTLHTNDAASAATRLIDMGIEPYL
 ITSTVLGFMAQRLVRVICTQCKETYKPTTSELESIGISKKFLKGNLHRGKGCSCMGTGPKGRIGIYELLLV
 NSPLKQAILHGKDAGQLNEIALEHGFRTLKDYGIRKVV DGVTTIDEVLRVT

Secuencias de aminoácidos de GspD_L y GspE_L de la serovariedad Lai (NCBI, número de acceso CN 004342). Las áreas sombreadas con colores verde y rojo, indican las regiones conservadas (serovariedad Copenhageni y Hardjo) sobre las que se diseñaron los iniciadores degenerados para PCR BAP2357 y BAP2358.

6.5 Síntesis de iniciadores y secuenciación de ADN

Para sintetizar los iniciadores y obtener las secuencias de los productos de PCR generados del locus *gsp* (SST-II) en la serovariedad Patoc, se solicitó el servicio externo del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Av. Universidad 2001, Cuernavaca Morelos México. Las secuencias de los iniciadores se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Iniciadores utilizados para la PCR

Clave BAP	Orientación	Composición nucleotídica 5' - 3'	pb	Región sobre la que amplifica
607	r	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G	19	pBlue Script
612	u	GTA AAA CGA CGG CCA GT	17	pBlue Script
1801	r	CAT GAA CCA AGG CAT ACC	18	<i>orfp9</i>
1802	a	AGA AGA AGT TTA ACG GGG	18	<i>orfp9</i>
2357 ³	a	ACN GTN GAY AAY CAR GAR GC	20	<i>gspD</i>
2358 ³	r	AC CAT DAT NAC RTC NGG RTC	20	<i>gspE</i>
2360	a	AAA GTC CAA AAG ATC CCC	18	<i>gspD</i>
2362	a	AAC CAC TCT CTA TTC TGC	18	<i>gspE</i>
2363	r	ATT CAA AGT TGG CTA CCG	18	<i>gspD</i>
2364	r	TCT TTT AAG ATT TGA GGG	18	<i>gspF</i>
2365	a	TCC GAT GGA TGA TAT GCG	18	<i>gspE</i>
2376	r	AGA ACT TCG AGT AAC ACC	18	<i>gspD</i>
2387	r	TCC ATC GGA TGG AGG TCC	18	<i>gspE</i>
2388	r	TGT TTG TCA TTG GAG AGG	18	<i>gspD</i>
2390	a	ATT GTG GAG CTT AGT TCG	18	<i>gspD</i>
2394 ³	r	TCN CCN GCN GCD ATC ATN CC	20	<i>gspF</i>
2406	a	ACT TTA TAC CTA CGT TGC	18	<i>gspF</i>
2407	r	ACT TGG GTA TTG GTC GGG	18	<i>gspF</i>
2408	r	AAA GGC ATC TTC AAT CCG	18	<i>gspD</i>
2409	a	AGT CGG TTT TGG AAA CCC	18	<i>gspC</i>

Además de la orientación de cada iniciador (r = reverso; a = adelantado) y de su composición nucleotídica (5' - 3'), se muestra sus longitudes (pb) y la región sobre la que complementa. 1: vector pBlue Script SK+; 2: *orfp9* del locus *rfb* de *L. biflexa* serovariedad Patoc; iniciadores degenerados, donde M = A/C, R = A/G, W = A/T, S = C/G, Y = C/T, K = G/T, V = A/C/G, D = A/G/T, H = A/T/C, B = C/G/T y N = A/C/G/T.

6.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El ADN genómico de *L. biflexa* serovariedad Patoc fue utilizado como templete para amplificar fragmentos de ADN conteniendo genes del SST-II mediante la PCR. La concentración de ADN que se utilizó fue de 250 ng, las reacciones se realizaron en un termociclador Gene Amp 2 400 PCR System¹ y en un termociclador con gradientes de temperatura PCR-Express². Las reacciones se realizaron en volúmenes de 25 µl, usando 2.5 unidades de la enzima *Taq* ADN polimerasa³ en cada mezcla; 1 µl de 10mM de una mezcla de dNTPs³, 2.5 µl de solución amortiguadora para PCR (10 X); 4 µl de MgCl 25 mM y 1 µl de iniciadores con una concentración aproximada de 20 pmol. Para generar los fragmentos de ADN *in vitro* se utilizó el siguiente protocolo: Una desnaturalización inicial del ADN a 94° C durante cinco min, seguido de 40 ciclos que incluyeron un paso de desnaturalización a 94° C durante 40 segundos; un paso de alineación de los iniciadores por 50 segundos, donde el intervalo de temperatura varió según el porcentaje de Guanina y Citosina (% G-C) de cada iniciador utilizado y un paso de extensión de la polimerasa a una temperatura de 72° C con un tiempo de aproximadamente 1 minuto por kb a amplificar. Finalmente, un paso único de extensión de la polimerasa a 72° C durante siete min (Figura 4). En algunos casos, para estandarizar la T_m (*melting temperature*) óptima de hibridación o temperatura de fusión de los iniciadores y eliminar fragmentos de ADN inespecíficos, se realizaron reacciones de PCR bajo distintas temperaturas de hibridación (Ausubel *et al.*, 1993; Sambrook and Russell, 2001). Los productos de ADN que se generaron mediante la PCR, fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1% (Apéndice II) y purificados por elusión de agarosa con un sistema comercial.⁴

¹ Perkin Elmer, EUA

² ThermoHybaid, RU

³ Roche Applied Science, Alemania.

⁴ QIAGEN GMBH, Alemania.

Cuando no se contaba con la secuencia para poder diseñar iniciadores y así poder seguir secuenciando, se utilizaron dos alternativas, la primera, PCR-inverso (I-PCR) (Sambrook y Russell, 2001) y la segunda PCR con un sólo iniciador específico (single specific primer-PCR, SSP-PCR) (Shyamala *et al.*, 1989) que se describen más adelante.

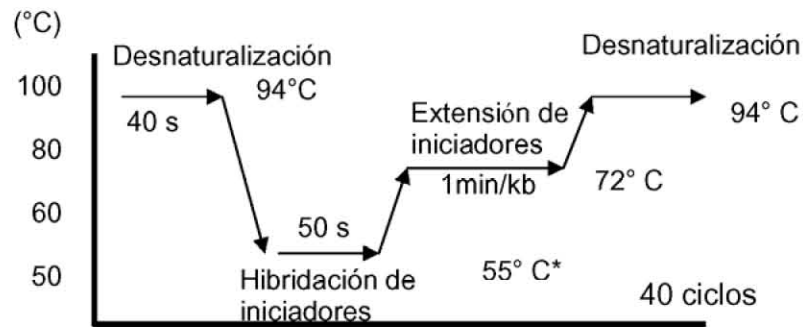


Figura 4. Constantes de la PCR. S = segundos; min = minutos; kb = kilobase; * = teperatura que varia según la composición de los iniciadores.

6.7 Digestiones y ligazones de ADN genómico

Las digestiones se realizaron en un volumen final de 50 µl, adicionando 5U de enzima (*Bam*HI, *Bgl*II, *Cl*aI, *Eco*RI, *Hind*III),² 5 µl del la solución amortiguada correspondiente (10 X) y 1 µg ADN genómico. Se adicionó agua desionizada estéril aforando a 50 µl. Los reactivos fueron mezclados mediante pipeteo. Las reacciones se incubaron a 37° C, el tiempo de incubación varió de acuerdo con la concentración de ADN, utilizando las siguientes condiciones: 5 U/1µg de ADN/60 min de incubación (Ausubel *et al.*, 1993). Las ligazones se realizaron en volúmenes de 30 µl, adicionando 1 µg de ADN (digerido y precipitado previamente según se ha descrito); 3 µl de solución amortiguada para ligasa (10X), 5U de enzima T4 ADN ligasa;³ ya aforando a 30 µl de agua desionizada estéril, e incubando a 4° C por un periodo de 12 a 16 h. Posteriormente, se

² Invitrogen, EUA y Biolabs, UK.

³ Roche Applied Science, Alemania.

precipitó el ADN recuperándolo en alícuotas de 35 µl y almacenándolo a 4° C hasta su uso (Ausubel *et al.*, 1993).

6.8 PCR Inverso (I- PCR)

Con base en una secuencia conocida de ADN que se obtuvo por un PCR previo, se diseñaron dos pares de iniciadores específicos en direcciones opuestas, los sitios de alineación se escogieron antes de la secuencia blanco de una enzima de restricción (*Bam*HI, *Bgl*II, *Cla*I, *Eco*RI, *Hind*III), previamente elegida. El templado para el método de I-PCR se obtuvo por medio de recircularización y ligazón de fragmentos de ADN obtenidos por digestión (según se ha descrito previamente) de ADN genómico de *Leptospira biflexa* serovariedad Patoc. Una vez recircularizados se realizó una PCR con los iniciadores específicos para amplificar un fragmento conteniendo una secuencia aún desconocida, localizada después del fragmento conocido. La digestión y ligazón fueron corroboradas por electroforesis en geles de agarosa al 1.0% (Apéndice II) y por medio de fotodocumentación en el programa de computadora BioEdit¹ (Ausubel *et al.*, 1993; Sambrook y Russell, 2001). En la Figura 5 se esquematiza el diagrama de flujo para elaborar un templado de ADN para I-PCR.

¹ BioRad, EUA.

Figura 5. Diagrama de flujo para la elaboración de un I-PCR

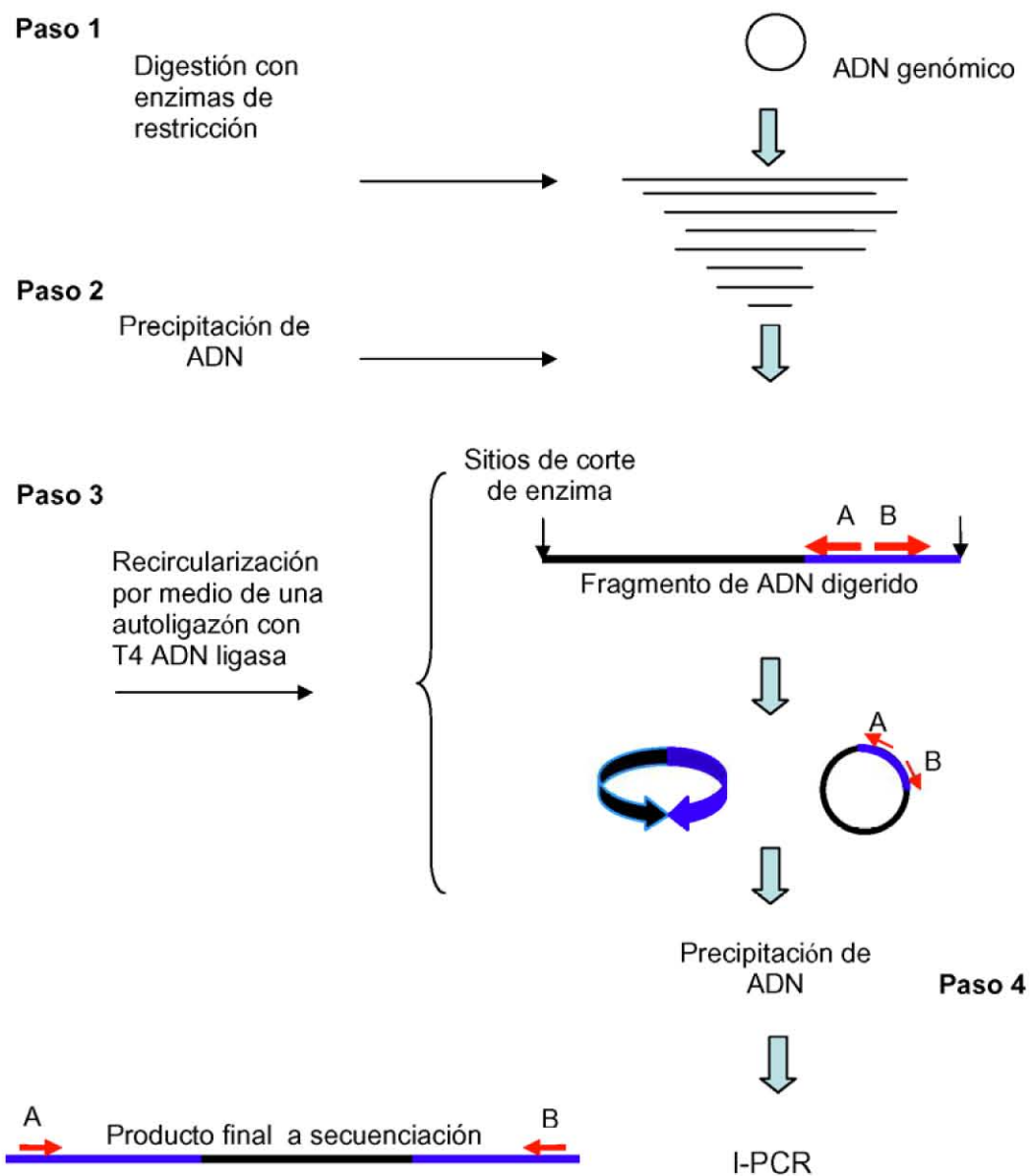


Diagrama de flujo para la elaboración del templado para un I-PCR (Sambrook y Russell, 2001). Paso 1. Se digiere el ADN genómico con la enzima de restricción adecuada; Paso 2. Se precipitan los fragmentos de restricción del ADN; Paso 3. Se realiza una autoligazón de los fragmentos de restricción previamente purificados por extracción fenólica; Paso 4. Se precipita el ADN recircularizado y se realiza la I-PCR para obtener el templado para secuenciación. Donde la línea azul representa la secuencia conocida sobre la que se diseñaron los dos iniciadores (Flechas rojas A y B) y la línea negra la secuencia por descubrir después de secuenciación con los referidos iniciadores.

6.9 PCR con iniciador único (SSP- PCR)

Para la SSP-PCR, se diseñó un iniciador específico sobre el extremo de la secuencia que se obtuvo mediante la PCR previa, dicho iniciador se diseñó frente a una secuencia blanco para corte con una enzima de restricción que se eligió previamente. El templado para esta técnica de PCR se obtuvo con las digestiones de ADN genómico de *L. biflexa* serovariedad Patoc y del vector pBlue Script² SK⁺ con la misma enzima (digestiones por paralelo). Las digestiones y ligazones se realizaron según se ha descrito previamente, la ligazón se realizó utilizando una proporción inserto-vector de 3:1 de ADN genómico y plasmídico, respectivamente. Antes de las ligazones, el vector fue tratado con fosfatasa alcalina para desfosforilarlo y así evitar la recircularización del ADN plasmídico. Las desfosforilaciones se realizaron en un volumen de 50 µl, adicionando 5 µl de solución amortiguada para fosfatasa alcalina (10X); 1U de fosfatasa alcalina¹ y aforando a 50 µl de agua desionizada estéril. La reacción fue incubada a 37° C durante 30 min. Posteriormente, se precipitó el ADN según se ha descrito, recuperándolo en alícuotas de 20 µl de agua desionizada estéril y almacenándolo a 4° C hasta su uso.

Todos los procesos fueron corroborados por electroforesis en geles de agarosa al 1% (Apéndice II) y registrados fotográficamente. Para realizar la PCR se utilizó el iniciador en el extremo de la secuencia conocida y uno de los siguientes iniciadores, el iniciador reverso (IR) (5' GGA AAC AGC TAT GAC CAT G 3') o el iniciador universal o M13 -20 (5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3'), ambos localizados en el vector pBlue Script, en dos reacciones de PCR por paralelo (Shyamala *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1993). En la Figura 6 se esquematiza el diagrama de flujo para obtener un templado de ADN mediante SSP-PCR para su posterior secuenciación.

¹ Roche Applied Science, Alemania

² Stratagene, EUA.

Figura 6. Diagrama de flujo para la elaboración de un SSP-PCR

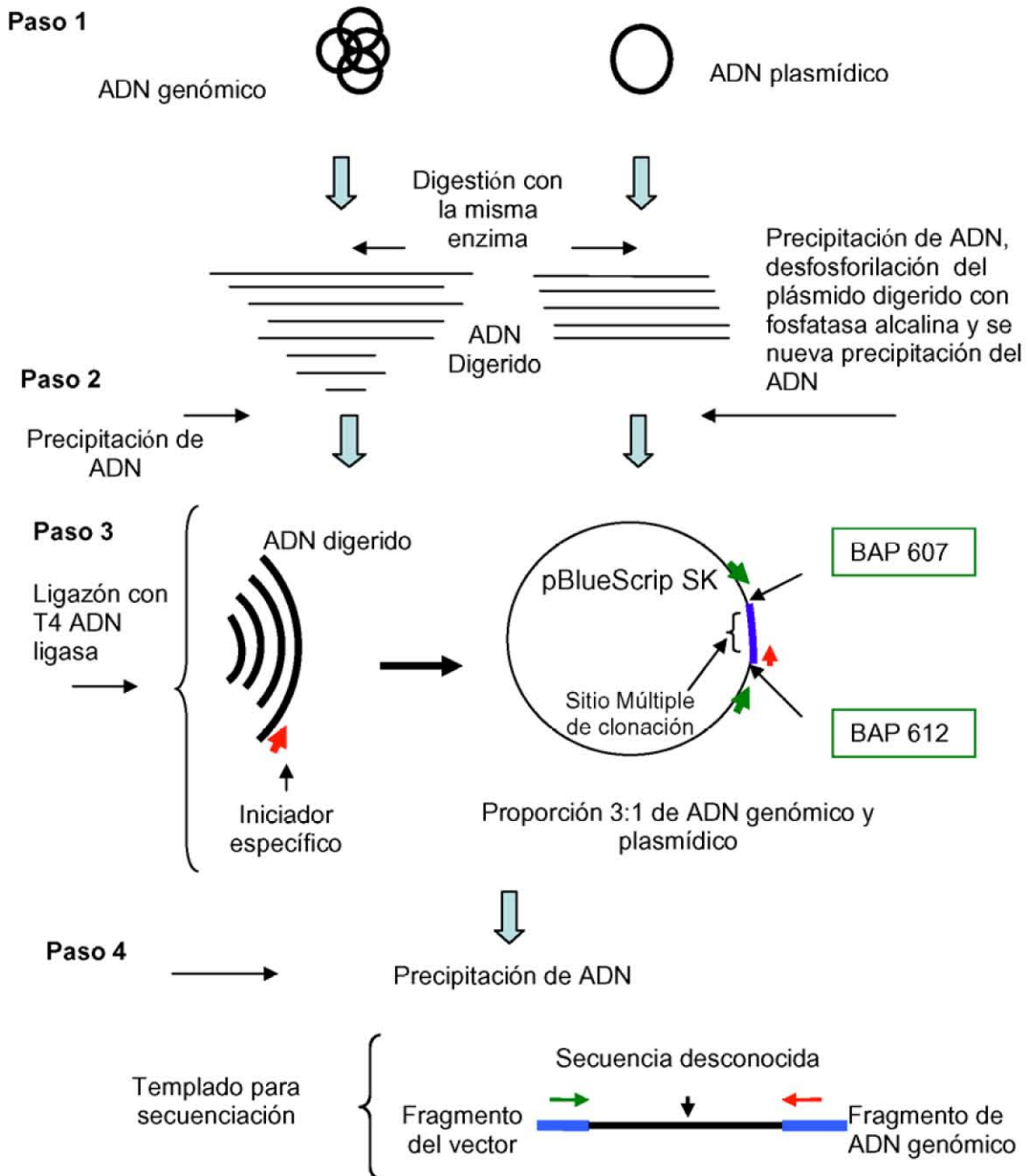


Figura 6. Diagrama de flujo para la elaboración del templado para mediante SSP-PCR (Shyamala *et al.*, 1989). Paso 1. Se digiere el ADN genómico y plasmídico por separado; Paso 2. El ADN genómico y plasmídico se precipitan por separado y el ADN plasmídico se desfosforila y nuevamente se precipita; Paso 3. Se realiza una ligazón con T4 ADN ligasa en relación 3:1 vector: inserto; Paso 4. Se precipita el ADN ligado con el inserto y se realiza la SSP-PCR donde un iniciador (flechas rojas) fue diseñado sobre la secuencia (línea azul) y el otro iniciador es el universal o el invertido (dependiendo de la orientación del inserto, flechas verdes). Paso 5. El producto final es un templado para secuenciación donde la línea negra representa la secuencia por descubrir.

6.10 Análisis de secuencias de ADN y proteínas de *Leptospira*

Las secuencias de nucleótidos de los genes homólogos a *gsp* en la serovariedad Patoc, se alinearon y almacenaron con el programa Sequencher¹ (versión 4.5).

Los análisis de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, así como la predicción de la estructura secundaria y terciaria de las proteínas se realizaron de la siguiente manera. Para buscar identidades y homologías, las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la serovariedad Patoc, se analizaron en línea con otros genes de leptospiros (serovariedad Copenhageni, Hardjo y Lai). Paralelamente, se seleccionaron las secuencias codificadas a aa de un grupo de 14 bacterias patógenas (mamíferos, peces y plantas) Gram negativas, para realizar alineaciones y buscar identidades individualmente entre secuencias de aa de GspD y GspE, las bacterias que se seleccionaron fueron: *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia pseudomallei*, *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora*, *Escherichia coli* K-12, *Escherichia coli* O78:H11, *E. coli* Dysenteriae (antes *Shigella dysenteriae*), *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Vibrio cholerae*, *Xanthomonas campestris* y *Yersinia pestis* (números de acceso en Apéndice III), bacterias donde se han reportado genes que codifican para el SST-II (Sandkvist *et al.*, 2001).

Con la finalidad de obtener las similitudes entre genes homólogos, se realizaron alineaciones mediante los programas BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) y mediante el programa ClustalW versión 1.82 del European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI, www.ebi.ac.uk/clustalw/). También, se utilizó el programa Vector NTI² Suite versión 5.5 para realizar alineaciones con la finalidad de buscar regiones conservadas entre leptospiros y homólogos en otras bacterias (*E. coli* K-12, *E. coli* O78:H11, *K. pneumoniae*, *Ps. aeruginosa* y *V. cholerae*). También, se utilizó este programa para generar los árboles filogenéticos, dicho programa utiliza el método NJ (Neighbour Joining) de Saitou y Nei.

¹ Genes Code Corporation, EUA.

² Informax, Inc

Por otro lado, se utilizó el banco de datos del programa Dominios Conservados (DC) de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>), con la finalidad de buscar regiones (dominios o módulos) que identifican a las bacterias por sus probables funciones, por medio de una colección de secuencias de aminoácidos de distintas bacterias.

Para la predicción de la estructura secundaria de la proteína, se almacenaron las secuencias de aminoácidos en el programa Vector NT1, vía dicho programa, se ingresaron las secuencias en el programa en línea NNPREDICT-Protein Secondary Structure Prediction de la Universidad de California, EUA (<http://www.cmpharm.ucsf.edu/>).

La predicción de la estructura terciaria de la proteína, se realizó por medio del programa en línea 3D-PSSM (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/>) del Imperial College of Science, Technology & Medicine del Reino Unido (Gómez y Valencia, 2003).

7 RESULTADOS

7.1 Cultivo y Extracción de ADN de *L. biflexa*

En promedio, el desarrollo de los cultivos de *L. biflexa* serovariedad Patoc en EMJH varió entre 5 a 7 días en alcanzar el 0.5 de turbidez según el nefelómetro de MacFarland que equivale a aproximadamente 10^6 leptospiras/ml.

La extracción de ADN genómico de la serovariedad Patoc se cuantificó a una concentración de ADN de 250 ng/ μ l en promedio.

7.2 Amplificación de genes del loci *gsp* en *L. biflexa* por PCR

Con los iniciadores degenerados BAP2357 y BAP2358 se realizó una PCR con gradiente de temperatura, donde se apreció que las mejores temperaturas para amplificar un fragmento de 1.5 kb fueron 57.4, 57.8 y 58.1° C. Se realizó entonces el ensayo a 58.1° C (Figura 7) y los fragmentos obtenidos se secuenciaron en la Unidad de Secuenciación del IBT-UNAM, Cuernavaca Morelos.

Los resultados de la secuencia generada con los iniciadores BAP2357 y BAP2358, se alinearon por medio del programa Sequencher y las secuencias se compararon con el cromatograma que incluye la secuencia. Con el iniciador BAP2357 se generó una secuencia útil de 585 pb y con el iniciador BAP2358, se generó una secuencia de 379 pb.

A partir de esta secuencia, se diseñaron distintos iniciadores (Cuadro 5) para generar mediante PCR los fragmentos de ADN y continuar la secuenciación. Los fragmentos de ADN fueron obtenidos mediante PCR directos, I-PCR y SSP-PCR.

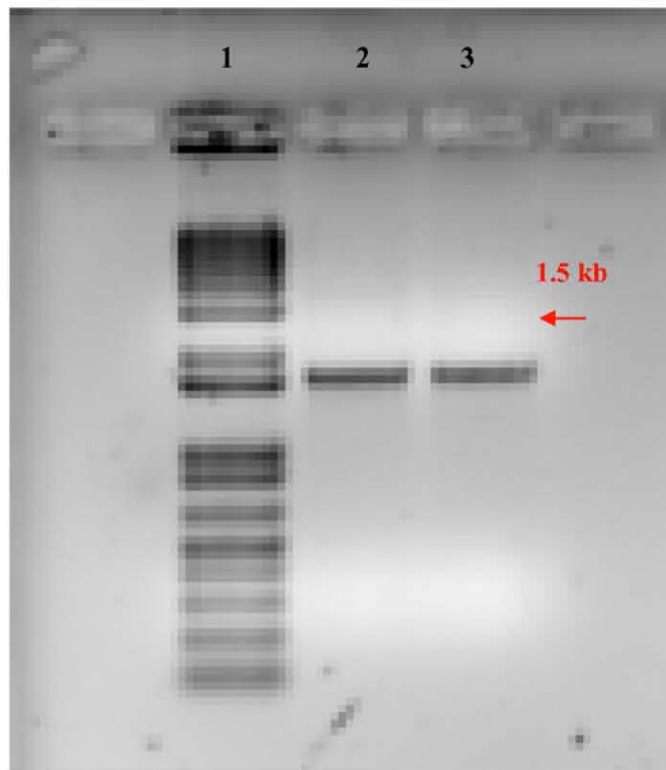


Figura 7. Imagen negativa de un gel de agarosa al 1% mostrando fragmentos de 1.5 kb de ADN, generados por PCR con los iniciadores BAP2357 y BAP2358 a 58.1 °C como temperatura de hibridación. En el Carril 1 se ubica el marcador de peso molecular 1kb plus (Invitrogen); carriles 2 y 3, muestran un fragmento generado con ADN de la SV Hardjobovis como control positivo y en el 2, el fragmento generado con ADN de la serovariedad Patoc de *L. biflexa*

En total, se generaron 22 fragmentos mediante PCR para completar la secuencia de los genes *gspD* y *gspE*. En la Figura 8 se muestran los genes *gspD* y *gspE* así como la dirección de las secuencias. En total se secuenciaron 4,807 pb, de las cuales, 376 pb corresponden a un fragmento de *gspC*; 1,788 pb a *gspD*; 1,677 pb a *gspE* y 966 pb a un fragmento de *gspF* (Figura 8), las secuencias obtenidas de *gspD* y *gspE* de la serovariedad Patoc de *L. biflexa* fueron registradas en el banco de datos GenBank de la NCBI (GenBank DQ489375 y DQ489376) (Apéndice III). Las secuencias de *gspD* y *gspE* fueron reveladas completas según los MAL que indica el programa Sequencher, además, comparando la longitud de *gspD* de la serovariedad Patoc, con sus homólogos en Copenhageni, Hardjobovis y Lai se encontró que *gspD* de Patoc es muy similar (1,788 pb) a los *gspD* de Copenhageni (1,791 pb) y de Hardjobovis (1,794 pb) con una diferencia de 3 y 6 pb respectivamente, a diferencia de su homólogo en Lai que es ligeramente más larga, con una diferencia de 60 pb (1,848 pb). La secuencia de *gspE* en Patoc (1,677) es muy similar a sus homólogos en leptospiros patógenas, ya que sólo hay una diferencia de mínima de 3 pb con Copenhageni y Lai (1,674) y una diferencia de 6 pb menos en Hardjobovis (1,671).

En las Figuras 9 y 10 se muestran las alineaciones por separado de *gspD* y *gspE* de la serovariedad Patoc, con sus homólogos en las tres serovariedades patógenas de *Leptospira* y a manera comparativa, también se alinea con los homólogos de *E. coli* K-12 y *Ps. aeruginosa*, donde se reconoce que hay diferencias en tamaño. Comparado *gspD* de Patoc, con su homólogo en *E. coli* K-12, se aprecia que es 165 pb mayor, igualmente *Ps. aeruginosa* es 189 pb mayor que la secuencia de Patoc (Figura 9). Contrastando, la secuencia de *gspE* de *E. coli* K-12 es 195 pb menor comparado con *gspE* de Patoc y por otro lado, *gspE* de *Ps. aeruginosa* es 108 pb mayor que en la serovariedad Patoc (Figura 10).

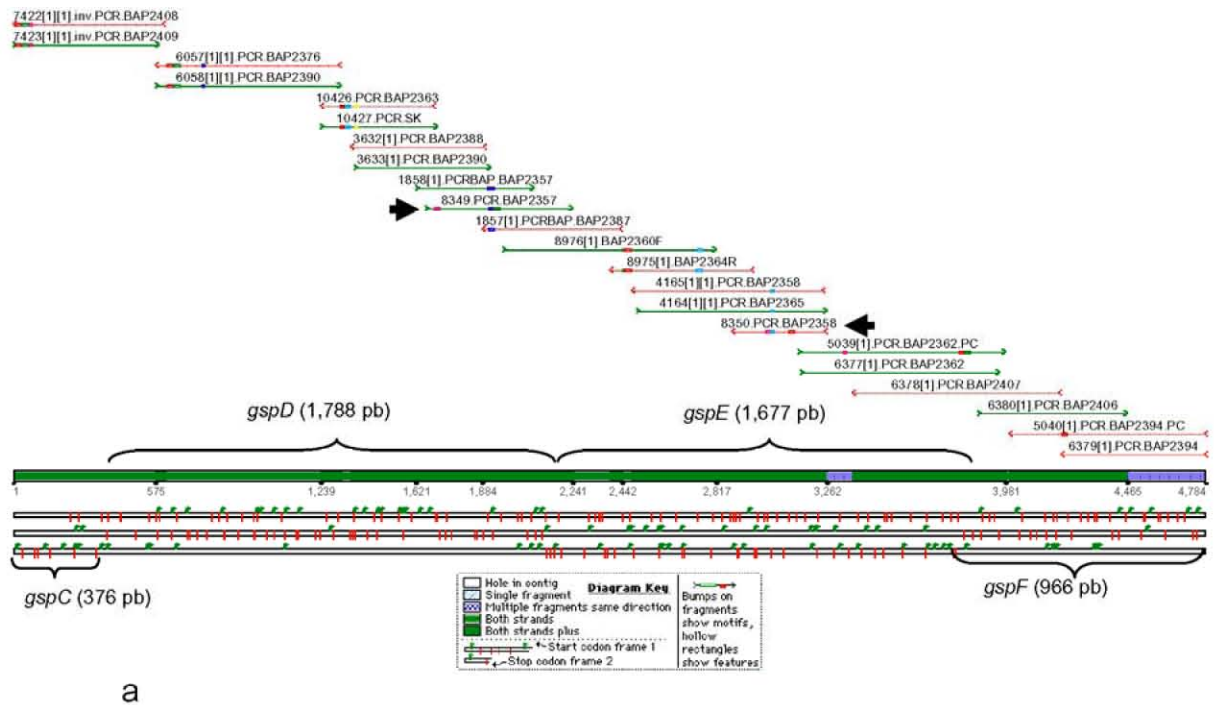


Figura 8. Identificación de *gspD* y *gspE* así como los fragmentos parciales de *gspC* y *gspF* de la serovariedad Patoc (4,807 pb) mediante el programa de alineación de secuencias Sequencher®. Las flechas verdes indican una secuencia con iniciador orientado río abajo y las flechas rojas indican una secuencia con iniciador orientado río arriba. Las flechas negras () indican el fragmento de ADN generado con los primeros iniciadores BAP2357 y BAP2358 (degenerados).

Figura 9. Alineación de las secuencias nucleotídicas de *gspD* de la serovariedad Patoc y sus homólogos en Copenhageni, Lai y Hardjobovis, además de sus homólogos en *E. coli* K-12 y *Ps. aeruginosa*. La alineación revela que hay regiones discontinuas en las secuencias de leptospiaras (ClustalW). Ecoli= *E. coli*; Ps= *Pseudomonas*; * = nucleótidos idénticos. Las regiones enmarcadas indican la secuencia única de la serovariedad Patoc.

Copenhageni	-----	
Lai	-----ATGTGGAAAGAGGTAGCCAGATTCTCACCTACGAATTTATT	41
Hardjo	-----	
PATOC	-----	
Ecoli	-----	
Ps	ATGTCCCAGCCTTTGCTCCGCGCCCTGTTTGCCCTTCCAGTCGTTCTGTACGTTCCCGCC	60
Copenhageni	-----ATGTCCGGAACAATCAG--TCAACTTTCAATCTTTAGAAT-ATT	41
Lai	ATCAGAAACTAAAAAGATGTCCGGAACAATCAG--TCAACTTTCAATCTTTAGAAT-ATT	98
Hardjo	-----ATGTACGGAACAATCAG--TCAATTTCAATCTTTAGAAT-ATT	41
PATOC	-----ATGAATTTATCAT--TCGGAATTAATAAGAGAAATCGACT	38
Ecoli	-----ATGAAAGGACTCAATAAAATCACCTGCTGCTTGTGTCGAGCAGCT	44
Ps	GTCCTTCTCAGCCTGGCCCTCGGCATCCAGGCGGCGCACGCCGAAAAACAGCGGGCGGAAC	120
	* * * *	
Copenhageni	CTCCCT-TCTCATACTTTTGTTTTGTAGTATGGGACAAAACAGTCTTTCTCAAAGTAAGA	100
Lai	CTCCCT-TCTCATACTTTTGTTTTGTAGTATGGGACAAAACAGTCTTTCTCAAAGTAAGA	157
Hardjo	CCCCAT-TCTCATACTTTTATTTTGTAGTGTGGGACAAAACCGGTATTTCTCAGAGCAAGA	100
PATOC	TCCCTC-AGTTGTACTTT-GTATTTGCCTTTACTTAATGTAAACCCCAACTTTTCACAA	96
Ecoli	ACTCATGCCTTGTGCAGGACAGCTGAGAACGAACAATACGGCGGAACTTCAATAACGC	104
Ps	GCCTTCGTCCCG-GCCGGCAACCAGCAGGAGGCGCACTGGACGATCAACCTCAAGGATGC	179
	* * * *	
Copenhageni	AAAAAACTCCGCAAAGACAAAATCG--GTTAC--TCAAGAAGAACCTTCGGAAAAAA	154
Lai	AAAAAACTCCGCAAAGACAAAATCG--GTTAC--TCAAGAAGAACCTTCGGAAAAAA	211
Hardjo	AAAAATCTTCCGTTAAACAAGATCG--GCCACCGCTCCGGAAGAACCGGCGGAAAAAGA	157
PATOC	GAGAAA-----GGAAAACCGAAAGCA--AAAAC--CTCACAAGAACAGCT-----A	139
Ecoli	CGATATCCGCCAGTTCGTGGAATAGTGGGTGAGCATCTTGGCAAAACGATCCTGATCGA	164
Ps	CGACATCCGCGAATTCATCGACCAGATTTCCGAAATCACCGGCGAGACTTCGTGTCGA	239
	* * * * * * * *	
Copenhageni	CT-TTCTATGCAAATGGAG-----AGATACAGAACTAAACGACTTTCTCAAAGGAATGA	208
Lai	CT-TTCTATGCAAATGGAG-----AGATACAGAACTAAACGACTTTCTCAAAGGAATGA	265
Hardjo	GC-TTTATGCGAATGGAG-----AGACACCGAATTGAACGATTTCTCAAAGGAATGA	211
PATOC	GT-TTCACTGCGGATGGAG-----GGATACAGAACTCAAAGACTTCTTATGGGAATGA	193
Ecoli	CCCTTCGGTACAGGGAACCATTTCCGTCAGCAGTAATGATACGTTTAGCCAACAGGAGTA	224
Ps	CCCGGGTCAAGGCCAGGTGAGCGTGGTCTCCAAGGCCAGCTCTCGTTGAGCGAGGT	299
	* * * * * * *	
Copenhageni	GCGCCA--TTTTAAAGAAAAATATTCTTTAGATGAAAGTTTAAAAGGTAAAAAATTAC	266
Lai	GCGCCA--TTTTAAAGAAAAATATTCTTTAGATGAAAGTTTAAAAGGTAAAAAATTAC	323
Hardjo	GCGCTA--TCTTAAAGAAAAACATTCTTTAGATGAGAGTTTAAAAGGTAAAAAGATTAC	269
PATOC	GTGCCA--TCATCAAAAAAATATTCTGATCGATGATGCGGTGAAAGGCCAAAAAGATCAC	251
Ecoli	CTACCAGTCTTTTTAAGTATTCTTGATCTTTACGGTTATTCCGTGATCAGCTGG--AC	282
Ps	CTACCAGTTGTTCTCTCGTGTAGGACCCACCGGCTTCCCGTGGTTGCCAGG--GC	357
	* * * * * * *	
Copenhageni	GATCATTTCTCAAAGGAAATCCGATCAAAAATGGATTTATCTTTATGAAATCTGTTTT	326
Lai	GATCATTTCTCAAAGGAAATCCGATCAAAAATGGATTTATCTTTATGAAATCTGTTTT	383
Hardjo	GATCATTTCTCAAAGGAAATCCGATTAAAAATGCATTATCTTTATGAAATCAGTTTT	329
PATOC	AATCATTTCTCAAACAGGATTCGATTAAGATGCCTTTGGATTTATGAAGTCGTTTT	311
Ecoli	AATGGTTTTCTGAAAGTG-GTTCGCTCAGCTAATGTA AAAACATCGCCAGGGATGATTGC	341
Ps	GACCAGGCGCATCGTG----CCCAACCGCGGCAAGAC----CGAGGCCGCGCGC	408
	* * * * * * *	
Copenhageni	AGAATCTCTAGGTTTCGGAGTAGTAGAAGAACCGGATCTCATTTCGATTGTTAAAATTA	386
Lai	AGAATCTCTAGGTTTCGGAGTAGTAGAAGAACCGGATCTCATTTCGATTGTTAAAATTA	443
Hardjo	AGAATCCCTCGGTTTGGCGTGGTGAAGAACCGGATCTGATTTTCGATTGTCAAAGATTAA	389
PATOC	GGAAACCCAAAGGTTTGGACTCATCGAAGAAAATGACCTCATTAAAGTTGTCAAATCAA	371
Ecoli	TGACAGTCTCGTCCAGGCGTAGGTGATGAGTTGG--TCACCCGAATTGTACCGCTTGA	398
Ps	GGCCAC-----AGCGCGCGGATCGCCTGGA--GACGCGGTGATCCAGGTCCA	455
	* * * * * * *	
Copenhageni	AGATGCACTTGCTAGATCTCCTATCGTTAGGGTCGGA AAAAG-AATTGATTCCCGAAGAGG	445
Lai	AGATGCACTTGCTAGATCTCCTATCGTTAGGGTCGGA AAAAG-AATTGATTCCCGAAGAGG	502
Hardjo	GGATGCGCTTGCAAGATCTCCCGTGGTCCGAGTCGGTAAGG-AATTGATTCCCGAAGAGG	448
PATOC	AGACGCACTCGCTAAGTCAAAATTTGTCGGATCGGAAAGG-ATCCAGTCTCTGATTCGG	430
Ecoli	GAACTGTTCCGCTCGTGACCTGGCCCCCTGCTCCGCCAGATGATGGATGCGGGTAGCGT	458
Ps	GCAGAGCCCGGATCGGAATCATCCGCTGATCCGTCGCG--TGGTCCCACAATATGG	512
	* * * * * * *	

Figura 9. Continua. Alineación de las secuencias nucleotídicas de *gspD*

Copenhageni	AAGTTGGAGATTATAGAACGATCACTCAGGTCATTCTTATTGAAAATGTAAAACCGAGAAG	505
Lai	AAGTTGGAGATTATAGAACGATCACTCAGGTCATTCTTATTGAAAATGTAAAACCGAGAAG	562
Hardjo	AAGTCGGCGATTACAGAACGATCACTCAGATTATCTTATTGAAAATACAAAACCGGAAG	508
PATOC	AAGTTGCCTTAAACAAAATATCACTCAGATTGTTCCACTAGAGTTTTCGAATGCCATTG	490
Ecoli	CGGTAATGTTGTGCATTATGAACCTCCAA-CGTTCTTAT-----TCTGA--CCGGTCG	509
Ps	CCACCTCGCCGCG---GTGCCCTCGGCCAACCGCTGAT-----CATCA--GCGACCG	560
	* * * * *	
Copenhageni	AATTAGAACCTATTTTAAACGCTTACTTCTCCTAATACG--GATGTGATCGTT-TATA	562
Lai	AATTAGAACCTATTTTAAACGCTTACTTCTCCTAATACG--GATGTGATCGTT-TATA	619
Hardjo	AACTAGAACCGATTCTCAAACGCTGACGCTCCAAATACG--GATGTAATCGTT-TATA	565
PATOC	AACTTGAGCCCATCTTGAACGCTGTACGCTCTCCCGATACC--GATATCATCATT-CCTA	547
Ecoli	TGCCTCCACCATTAATAAACTGATTGAAGTCATAAAGCGCGTTGATGTATCGGCACAGA	569
Ps	CAGCGCAATATCGCGGAATCGAAGACGTGATCCGCCAGCTCGACCAGAAGGGCAGCCA	620
	* * * * *	
Copenhageni	GAAATACAAATACGATTGTACTT--TCAGGTTCCGCGCAGACATCAATAA-ATTGTTGG	619
Lai	GAAATACAAATACGATTGTACTT--TCAGGTTCCGCGCAGACATCAATAA-ATTGTTGG	676
Hardjo	GAAATACGAAACGATTGTTCTT--TCCGGTTCCGGAGCTGACATCAATAA-ATTGCTGG	622
PATOC	AAAACAAAACACATTGATTTTT--TCTGGTTCCACAGCAGATATCAACAA-ATTACTCA	604
Ecoli	GAAGCAGCAAATTTTTCATCTGGAATATGCGTCAGCGGAAGATCTCGCCGAGATTCTTAA	629
Ps	CGACTACAGCGTGATCAACCTGCGCTACGGCTGGGTGATGGACGCGCCGAGGTGCTCAA	680
	* * * * *	
Copenhageni	T--ACTTGTAAAGCGAATTTGACGTCAAAATCGAAGAGGCGACCCAGGATCGATTTCATC	677
Lai	T--ACTTGTAAAGCGAATTTGACGTCAAAATCGAAGAGGCGACCCAGGATCGATTTCATC	734
Hardjo	T--TTTGATAAACCAACTCGACCTGAAATGCAAGAGCGCAAGTCCGGGGCAATCCCGCTC	680
PATOC	A--GTTAGTTGATAATTTGGATGTAAGAGCAGATGGA-----CCCGGGTCCATTTCTTC	656
Ecoli	TCAAATTAATCAGCGAAAGCCACCGGTAAAAGCCAGATGCCAGCCCTCTCTCCGCGAAGAT	689
Ps	CACGCCATGAGCCGCGCCAGGCCAAGGGCGCGGCG-----GGCGCCAGGT	728
	* * * * *	
Copenhageni	GGCAGGTGATATTCATATTTATACTTTGGAATACAGTGAAGCTGAAAAAAT-CGCGGCGA	736
Lai	GGCAGGTGATATTCATATTTATACTTTGGAATACAGTGAAGCTGAAAAAAT-CGCGGCGA	793
Hardjo	CGCCCGTGACGTGCACATTTATACTCTGGAGCATAGCGAGGCCGAAAAGAT-CGCGGCCA	739
PATOC	GGCTGGTGACATCCATATTTATACTTTGGAATACAAATGAAGCAGAAAAACT-CGCAGCCA	715
Ecoli	TGTGGCGGATAAGCGAACCAACTCTCTTATCATCAGTGGACCGGAAAAAGCACCGCCAGCG	749
Ps	GATCGCCGACGCGCCACCAACCGCTGATCATCTCGGCCCGCCGAGGCGCGGCCAA	788
	* * * * *	
Copenhageni	CTTTAGTTAA--GTTAGACAATCCTG-----TGATTTCAG-	768
Lai	CTTTAGTTAA--GTTAGACAATCCTG-----TGATTTCAG-	825
Hardjo	CTCTCGTTAA--ATTGGATAACCCCTG-----TGTTCAA-	771
PATOC	TCCTTGTGAA--ATTGGATATGCCTG ATGCGCTGTGCTCCG -----ACGACTCAAG	766
Ecoli	CATCACTTCATTACTGAAAAGCCTTGATGTGCAAGAGAGCGAGGAAGAAATAACCCGGT	809
Ps	GCTGGTGCAACTGGCGCAATCGCTGGACCCCGACCGCGCTCGGCCAACACCCGAGT	848
	* * * * *	
Copenhageni	-----TCTGAAGATCTG-----GGTTCTGAAAGAAAGCCTCCAC---CGCCAGG	809
Lai	-----TCTGAAGATCTG-----GGTTCTGAAAGAAAGCCTCCAC---CGCCAGG	866
Hardjo	-----TCTGAAGATCTG-----GGTTCTGAAAGAAAGCCTCCAC---CGCCAGG	806
PATOC	GTGCA CTGGTGAAGCG-----AGCCCCGAGAAAAAGTTCCG-----GG	812
Ecoli	TTATTACCTGAAATATGCTAAAGCCACGAATCTGGTGAAGTGCTAACCCGGTGTTCGGA	869
Ps	GATCCGCTGCGCCACAACGACCCAGCCCTCGCGGAAACCTCGGCCAGATTTCCGA	908
	* * * * *	
Copenhageni	GCAACCTAT-----GCCTAAGGT-----AGATAA	833
Lai	GCAACCTAT-----GCCTAAGGT-----AGATAA	890
Hardjo	ACAGATAAC-----CATGAAAGT-----GGAGAA	830
PATOC	ACAGCCAAC CGCCCAAGC CCCAAGGTT-----CAGGCAAAACAGATAA	857
Ecoli	AAAGCTGAAAGATGAAAAAGGGAATCGCGTAAGCCCTCCTCTTCTGGCGGATGGATAA	929
Ps	AGGCATGAAGAACAATGCGCGCCAGGGCGCGAACAGACCCGCGCGGCCAGCAGCAA	968
	* * * * *	
Copenhageni	GATCAAGGCGGTTGGCCATAAAGAATCCAATTCTGTGATTGTTACGGCGACAAATGCGGA	893
Lai	GATCAAGGCGGTTGGCCATAAAGAATCCAATTCTGTGATTGTTACGGCGACAAATGCGGA	950
Hardjo	GATCAAGGCGAGTAGGTCATAAAGAATCTAATTCCGTTATTGTAACCGCAACGAATGCCGA	890
PATOC	AATCAAAGCAGTGGCCATAAAGAATCGAATTCACTCATTGTAACAGCCACGCCACAAGA	917
Ecoli	CGTCCGCAATACCGCCGATGAACAGACTAACTCTCTGGTCATTACCGCTGACCAGTCCGT	989
Ps	CATCCTCATCCGTGCCGACGAAAGCACCAACGCCCTGGTCTCTGCTGGCCGACCCGGACAC	1028
	* * * * *	
Copenhageni	ATGGGCAGAAATCCGTAATAATCATTAAAGTTTTGGATTGATTGATAAGAAACAGGTTTTATT	953
Lai	ATGGGCAGAAATCCGTAATAATCATTAAAGTTTTGGATTGATTGATAAGAAACAGGTTTTATT	1010
Hardjo	ATGGGCGGAGATTGAAAGATCATTAAAGTTTTGGATTCCGCTCGAAAAACAGGTTCTCTT	950
PATOC	ATGGGAAGAAATTAATAAATCATCAAATCTAGATACACCGAGAAAAACAGGTGTTACT	977
Ecoli	CCAGGAAAAACTCGCCACGTAATGCGCGTCTGGACATTCCGCGTGCACAGGTGCTGGT	1049
Ps	GGTCAACGCTCTCGAAGACATCGTTCGCCAGCTCGACGTGCCGCGTCCAGGTTATGGT	1088
	* * * * *	

Figura 9. Continua. Alineación de las secuencias nucleotídicas de *gspD*

```
Copenhageni    AGAAGTTTTGATCGTGGAACTTACTTCCAGTGATTAAACGATTTGCGGGATCGATTGGAG 1013
Lai            AGAAGTTTTGATCGTGGAACTTACTTCCAGTGATTAAACGATTTGCGGGATCGATTGGAG 1070
Hardjo        AGAAGTGCTAATTGTGGAACTTACTTCTAGCGACTTGAACGACTTTCGCGGATCGATTGGAG 1010
PATOC        CGAAGTTCATTGTGGAGCTTAGTTCGACTGATTAAATGATTTGGTATCGATTGGCG 1037
Ecoli        TGAGGCAATCATCGTTGAAGTTCAGGATGGAAATGGACTAAACCTCGGCGTGCATGGGC 1109
Ps           GGAAGCGGCCATCGTCGAGATCTCCGCGCATCCAGGATGCGCTCGGCGTGCATGGGC 1148
              * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *
Copenhageni    ATATAAGGGGGAAGCTTTCGGTCAATTCAATT-----CTGGTCTTT----CTAA 1058
Lai            ATATAAGGGGGAAGCTTTCGGTCAATTCAATT-----CTGGTCTTT----CTAA 1115
Hardjo        ATATAAGGGGAGAGGCTTTTGGTCAATTCAACT-----CGGGTCTTT----CTAA 1055
PATOC        TTACCAAGAGCTTGCCATGGACAGTTTAAACA-----CAGGTCTTG----CGGC 1082
Ecoli        GAATAAAAACGTTGGCGCACAGCAATTTACCAATACCGGATACCAGATTTTAAACGCTGC 1169
Ps           GATCAACAAGGCGGCATGGGCGGAACCAAGA-----CCAACTTCG----- 1189
              * * *          * * *          * * *          * * *          * * *
Copenhageni    AGAAGCGAATATTATCAATTGAAACGGTCAAGTCAATCCGAACATAAAACACTCTGAGTGG 1118
Lai            AGAAGCGAATATTATCAATTGAAACGGTCAAGTCAATCCGAACATAAAACACTCTGAGTGG 1175
Hardjo        AGAGGCAAATATCATCAATTCAAACGGACAAATCAATCCAAATGTCAACACACTCAGCGG 1115
PATOC        ACAAGGGGAGTGATCGATAAAAATGGTTCCTA---CCAATGTGAACACACTATCTGG 1139
Ecoli        GCAAGGTGTGGCTGATTATAAAAAGAAATGGTGGGATCACCGCGCGAA--TCCTGCCTGG 1227
Ps           CCAATACCGGACTGCTCCATCGCACCCTGCTGCAATCGCTCGAGAGCAAACAAGGCACCGG 1249
              * * *          * * *          * * *          * * *          * * *
Copenhageni    TTTCTCTTTAGGATTTTAAAAGCTGGTTGCGAA-----CAAATCATA----GGAATT 1167
Lai            TTTCTCTTTAGCATTTTAAAAGCTGGTTGCGAA-----CAAATCATA----GCAATT 1224
Hardjo        TTTCTCTTTGGGGTCTTAAAAGCAGGTTCGAA-----CAGATCATC----GGAATT 1164
PATOC        TTTTTCAGTGGATTCATCCGCGGTGGTGGGCAA-----CAAATCATT----GGTATT 1188
Ecoli        GATATGTTTAGCGCCTACATGGCATGGCCCGCAGGCTTCTTCAATGGCGACTGGGGAGTA 1287
Ps           AATCCATCC---CCGACGGGCGCCATCGTGCGCA---TCGGCAGCAGCAGCTTCGGGCGG 1302
              * * *          * * *          * * *          * * *          * * *
Copenhageni    TTAAGCGCCAATCAAGGAAATGAAAACCTTAAACG-TGTTATCTGCTCCTCAAGTGC--TT 1224
Lai            TTAAGCGCCAATCAAGGAAATGAAAACCTTAAACG-TGTTATCTGCTCCTCAAGTGC--TT 1281
Hardjo        TTAAGTGCTAACCAAGGAAATGAAAACCTTAAACG-TATTATCCGCTCCTCAGGTAC--TC 1221
PATOC        TTGAATGCAAACCTCAACAATGAAAACCTCAATG-TATTGTGCGGCTCCGCAAATTT--TG 1245
Ecoli        CTGCTTACCGCGCTGGCCAGTAACAATAAAAATGACATCCTCGCCACCCCAAGCATCGTA 1347
Ps           CTGGTCAACCGCGCTCTCGGCCAACCAAGAGCAACCTGCTGTCGACCCCGAGCCTGTTG 1362
              * * *          * * *          * * *          * * *          * * *
Copenhageni    ACGGTAGATAATCAAGAAGCAGAAAATCAGTGTGGGTCAAGACGTGCCCGTTGAACTCAG 1284
Lai            ACGGTAGATAATCAAGAAGCAGAAAATCAGTGTGGGTCAAGACGTGCCCGTTGAACTCAG 1341
Hardjo        ACCGTGGATAATCAAGAAGCAGAAAATCAGTGTGGGTCAAGACGTGCCCGTTGAACTCAG 1281
PATOC        ACCTTGACAAACCAAGGACAGAAAATCAATGTGGGTCAAGACGTGCCCGTTGAACTCAG 1305
Ecoli        ACGCTGGATAATAAATCAGCGTCTTCAACGTTGGGCAGGATGTGCCGGTGC-TATCCGG 1406
Ps           ACCCTGGACAAACGAAAGCGGAGATTCTGGTGGCCAGAACGTAACGTTCCAGACCCGGC 1422
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Copenhageni    AGTAGGAACGCAGGTACTGGTGG---AACGAACGCTGTAACGTGGGACAATTACGAATAT 1341
Lai            AGTAGGAACGCAGGTACTGGTGG---AACGAACGCTGTAACCGTGGGACAATTACGAATAT 1398
Hardjo        AGTAGGAATGCCGGTACCGGTGG---AACAAATGCCGTTACAGTAGACAACTACGAATAT 1338
PATOC        AATCGAAATGCCGGTCTTGGTGG---AGACAAACGCCGTAAACCGTAGCCAACCTTGAATAC 1362
Ecoli        GTCACAGAC-----CACTTCAGG---GGATAACGCTCTTA-----ATACCGTGAACGC 1452
Ps           TCCTACACCAACACAGCGAAGGTTTCGAGCAACCCGTTC-----CCACCGTGGAGCGC 1476
              * * *          * * *          * * *          * * *          * * *
Copenhageni    CGTCTACCGGTATCAAACCTAAGTTTACTCCTCAGTGAACAAAAATAATAAGATCACT 1401
Lai            CGTCTACCGGTATCAAACCTAAGTTTACTCCTCAGTGAACAAAAATAATAAGATCACT 1458
Hardjo        CGTCCGACAGGTATCAAACCTAAGTTTACTCCTCAGTGAACAAAAATAATAAGATCACT 1398
PATOC        CGTCCAACAGGGATTAACCTAAGTTTAACCCACATATCAATAAAAACAAACCGCATCACT 1422
Ecoli        AAAACGGTGGGGACAAACCTCAAAGTACTCCTCAGGTCAATGAAGCGCAGCGGTGTTG 1512
Ps           AAGGATATCGGCGTCAAGGTCCTCCGCACATCAACGACGGCGCGCCCTGCGC 1536
              * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *          *
Copenhageni    CTCGAACTCTTTCAGGAGATTAATAATATCGCAGAGATTGCTCT-----CGCCGGAGGA 1455
Lai            CTCGAACTCTTTCAGGAGATTAATAATATCGCAGAGATTGCTCT-----CGCCGGAGGA 1512
Hardjo        CTCGAACTCTTCAGGAGATTAAGAAATATCGCTGAGATTGCCCT-----TGCCGGAGGG 1452
PATOC        CTCGATTTGTACCAAGAAATCAAAAACGTCGCGGGATTTTCATCGGAAGCCACTGGTGGA 1482
Ecoli        CTCGAAATAGAGCAGGAACTCTCCAGCGTTG--ACTCTTCTCT--AACTCGAGCTCGG 1568
Ps           CTGAGATCGAGCAGGAGATCTCGGCGCTGCTGCCAACGCCACGCGCAACAAATACC 1596
              * * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *
Copenhageni    AACCTACTTTCAATCGAAGAGAAATTAACCTTCTATCTCAATTGAAAACTCAATCT 1515
Lai            AACCTACTTTCAATCGAAGAGAAATTAACCTTCTATCTCAATTGAAAACTCAATCT 1572
Hardjo        AATCCGACTTTCAATCGACGCGAAATCAAACTTCCATTCCATTGAAAACTCAGTCT 1512
PATOC        AACCCAACGTTTAATAAACGATGATCAAAAACAACCATCGTGTGGATAATATCCAAACC 1542
Ecoli        --CCGACGTTTAATACCGTACTATTCAAAACGCCGCTGGTCAAAAACCGGTGAAACG 1626
Ps           GACCTGATCACCAGCAAGCGCTCGATCAAGAGCACCATCCTCGCCGAGAACGGCCAGGTG 1656
              * * *          * * *          * * *          * * *          * * *
```


Figura 9. Alineación de las secuencias nucleotídicas de *gspD*

```

Copenhageni   ATCGTGATCGGTGGATTGATTTCGAACGATAAACAAAAAGAATCATTAAAATTCCTTTT 1575
Lai            ATCGTGATCGGTGGATTGATTTCGAACGATAAACAAAAAGAATCATTAAAATTCCTTTT 1632
Hardjo        ATCGTGATCGGGGACTTATCTCAAATGATAAACAAAAAGAGGATTATTAATTCCTTTT 1572
PATOC         ATTGTGATAGGAGGACTCCTCTCCAATGACAAACAAAAGAAAGTGCAAAGATCCCCATT 1602
Ecoli         GTGGTCCTGGGCGGATTGCTGGATGATTTTTCTAAAGAGCAAGTGTCAAAGGTTCCCTCG 1686
Ps            ATCGTGATCGGCGCCTGATCCAGGACGAGTTTCCCAAGCCGAGTCGAAGGTTCCCTCG 1716
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Copenhageni   CTAGGAGACATTCGGTATTTAGGTCACTCTTTTAAAAGAACTACTGAAAAAATTA AAAAG 1635
Lai            CTAGGAGACATTCGGTATTTAGGTCACTCTTTTAAAAGAACTACTGAAAAAATTA AAAAG 1692
Hardjo        CTGGAGATATTCGGTATTTAGGTCACTCTTTTAAAAGAACTACTGAAAAAATTA AAAAG 1632
PATOC         TTAGGGGAGATTCCTCTCTGGGACTTTGTTTCGTGATCCACAAACCAAATCGCAAAA 1662
Ecoli         CTTGGCGATATTCCTTTAGTGGGGCAACTCTTCCGCTATACCTCCACCGAGCGCGCTAAA 1746
Ps            CTCGGGGACATCCCAATGCTCGGTGCGCTGTTCCGTTCCACCAAGGACACCCACCAAG 1776
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Copenhageni   ACCAECTTGATGGTTTTTATTACGCCCATATACTCGATAGTAGAGAGACTGCGGATAAG 1695
Lai            ACCAECTTGATGGTTTTTATTACGCCCATATACTCGATAGTAGAGAGACTGCGGATAAG 1752
Hardjo        ACGAECTTGATGGTTTTTATCACACCGCATATACTGGACAGTAGAGAAAAATGCGGATAAG 1692
PATOC         ACCAECTTGATGGTTTTTAAACACCGCACATTCTGGACGATCGGGATAAATCGGATCGA 1722
Ecoli         CGCAECTGATGGTATTATCCGTCCG---ACGATTATCCGTGACGATGATGTTTATC-G 1802
Ps            CGCAECTGATGGTCTTCTGCGTCCCT---ACGGTGGTCCGCGACAGCGCGGTC-TCGC 1832
              ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Copenhageni   ATGACTGTT-AAGAAAAAATGCAGC-----AGGAACGTTACGAACTCGA 1739
Lai            ATGACTGTT-AAGAAAAAATGCAGC-----AGGAACGTTACGAACTCGA 1796
Hardjo        ATGACCGTG-AAGAAAAAGATGCTAC-----AGGAACAATACGAGCTCGA 1736
PATOC         ATGACCATCCAAAACAAAATGAACA-----ACAAAAGATGCTGGATGAA 1767
Ecoli         CTCACTGTC-AAAAGAGAAATACCCCGTTACCG--TCAGGAGCAACAACAGCGGATCGA 1859
Ps            CGCGCTCTC-GGGCAAGAAATACAGGACATCCGGTTCATCGACGGCACTCGCGGCCCGG 1891
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Copenhageni   GAGAGAA--AGAATCCTCAACAAAGAAAGAGAAATCAGA-----GAAAGAGGGGAT 1788
Lai            GAGAGAA--AGAATCCTCAACAAAGAAAGAGAAATCAGA-----GAAAGAGGGGAT 1845
Hardjo        AAGAGAA--AGAATCCTCAATAAAGAAAAAGAAATCAAATCTTTCTTTGAAAAAGAGGAT 1794
PATOC         CGAGAAA--AGAACTGAGATGA-----GAAAGAGGGGAT 1788
Ecoli         CGGGAAATCAAAGCGCTGGTTGGCTCGGAAGATTGCGGCTGGTGGATGAAAAACAGTT 1919
Ps            AGGGACGACCCAGCATCCTGCCGACCAACGCCAACCCAGT--TGTTGATGGACAGGCCGT 1949
              *
Copenhageni   TAA----- 1791
Lai            TAA----- 1848
Hardjo        -----
PATOC         -----
Ecoli         CAACAGTCACGCCCTGCGCCATCGTACGGTGA 1953
Ps            CGATCTGCGGAACTGATGACGGAATAA----- 1977

```

Figura 10. Alineación de las secuencias nucleotídicas de *gspE* de la serovariedad Patoc y sus homólogos en Copenhageni, Lai y Hardjobovis, además de sus homólogos en *E. coli* K-12 y *Ps. aeruginosa*. La alineación revela que las secuencias son más homogéneas y son de tamaños (longitud) similares (ClustalW). Ecoli= *E. coli*; Ps= *Pseudomonas*; * = nucleótidos idénticos.

Copenhageni	-----	
Lai	-----	
Hardjobovis	-----	
Patoc	-----	
Ecoli	-----	
Ps	ATGTCGGTGTTCGCCACCGCCGCCAGGACCGCCTGCTGGACCTCGGCGACCTGCTCCGC	60
Copenhageni	-----TTGAAAACCTCTCGGAGATATCCTAATCGAAGAGGGGA	37
Lai	-----TTGAAAACCTCTCGGAGATATCCTAATCGAAGAGGGGA	37
Hardjobovis	-----TAAAAATTGAAAACCTCTCGGAGATATCCTAATCGAAGAGGGGA	43
Patoc	-----ATGAGAAAAAGTTTAGGGCAGATTCTTTTAAAGATGGAA	40
Ecoli	-----	
Ps	GAGCTGGTCCGCCAGGGCCGGTCCGGCAGGAGCAGGCCGAACAGTGCCTGGCGATCCGC	120
Copenhageni	TCATATCTGAAAAAGATCTGGAAGATTCCCTAAAGGTTTCAGAAAAAAACAACCTTCCAC	97
Lai	TCATATCTGAAAAAGATCTGGAAGATTCCCTAAAGGTTTCAGAAAAAAACAACCTTCCAC	97
Hardjobovis	TCATATCCGAAAAAGATCTGGAAGATTCCCTAAAGGTTTCAGAAAAAAACAACCTTCCGC	103
Patoc	TCCCTACCATTAAAGGATTTAGAGGATATTTCCAAACAACAGGAAAAACAATCTTCCAC	100
Ecoli	-----	
Ps	CGCAGCGCGGTGCGCAACCAGCAGCATCCGCTGGAGTTCCTCGCCGCGCAGCAGGTCCGAG	180
Copenhageni	TCAGTCATATCATTTCAGAAAAAGGAATCGCCGGAGAAGCAGATATTCTCCGCGCCCTAT	157
Lai	TCAGTCATATCATTTCAGAAAAAGGAATCGCCGGAGAAGCAGATATTCTCCGCGCCCTAT	157
Hardjobovis	TCAGTCATATCATTTCAGAAAAAGGAATCGCCGGAGAACCAGATATTCTCCGTGCCCTTAT	163
Patoc	TCACTCATATCATCCAAAAAAGGACTCGCATCCGAAAACAGACATTTTAAAGGCACTGG	160
Ecoli	-----	
Ps	GATCTCAAGCGCCCGGACGCAAG--CTCGACCTGGAGACCCTCACCCAGTGGCTGGCCG	238
Copenhageni	CCAAACTCTATCAACTCGAATTTCAGAGAAAAGTTAGAGTTTACGGGTATGGAAGAAATAT	217
Lai	CCAAACTCTATCAACTCGAATTTCAGAGAAAAGTTAGAGTTTACGGGTATGGAAGAAATAT	217
Hardjobovis	CCAAACTCTATCAGTTTGAATTTCAGGAAAAACTTGAATTTACGGGAATAGAAGACGTAT	223
Patoc	CCAAACTCCATAGAAATGGAATTTACGACAAACTTGAGTTTGTGCGCAGTATGAGATCT	220
Ecoli	-----ATGAGAATTCA	11
Ps	AGTAGCCCGCCAGCCCTACCTGCGCATCGACCCGCTGAAGATCGACGTCCGCCCGGTGA	298
Copenhageni	TTTTACAAATTCTCTAAAACCTCATTTCAGAAAAGTAGAATCGTTCGGTTTTCTCTTTCTA	277
Lai	TTTTACAAATTCTCTAAAACCTCATTTCAGAAAAGTAGAATCGTTCGGTTTTCTCTTTCTA	277
Hardjobovis	TTTTACAAATTCCGTTGAAACTCATTCAAAAAAGCAGGATCGTTCATTTCACCTTTCCA	283
Patoc	TTAGTAAGATCCCTTTGAACTAGTCCAAACGTTCCAAAATTGTTCCCTTCTAGTCAAAG	280
Ecoli	CTCACCGTACCCCGCCAGTTGGGCGCTGGCACAAC-GAATTGGTTATCTCTATTTCAGAGG	70
Ps	CTCCGCTGATGTCCTACGCCTTCGCCAGCGCCATGGCATCCTCGCGTCCGCGTGAGTC	358
	* * * * *	
Copenhageni	AAAAACAATTTCGAATTGCTG-TATCCGATCCTTCTGATTTACATCCGATGGATGACGCT	336
Lai	AAAAACAATTTCGAATTGCTG-TATCCGATCCTTCTGATTTACATCCGATGGATGACGCT	336
Hardjobovis	AAAAGACGATTTCGAGTCGCG-TGTCGATCCGTCGATCTGCATCCGATGGACGACGTG	342
Patoc	GAAAAAAGTTTTTGTGCGCA-CAAGTGATCCAAACGGACCTCCATCCGATGGATGATATG	339
Ecoli	GCGAGATTATTATCTCGCCGATACGCCATTTCGAGCGGTT---ACTCGATATTCAACGTC	127
Ps	CGGAGGAATTCACCATCGCCAGCGCCAGCCCTTCGTACA-GGGCTGGAAAAGCAACCTG	417
	* * * * *	
Copenhageni	CGTAACCTTTCTAAAAGGTTACAACGTTGGAATTTATTCTCGCTCCGG----AACCGGAGA	391
Lai	CGTAACCTTTCTAAAAGGTTACAACGTTGGAATTTATTCTCGCTCCGG----AACCGGAGA	391
Hardjobovis	TGGAATTTCTAAAAGGATATAACGTAGAATTTGTTCTCGCTCCGG----AGCCGGAGA	397
Patoc	CGATCCTTTCTAAAAGGATACGAAATTCATTTGTTCTCGCAACCG----AGAACGAAA	394
Ecoli	AGG--TTGGCCAGTGCCAGACCATGACCAGCTTGT-CACAGGCTGA----TTTGAAGC	179
Ps	GTGCATGTGCTCAAGCGACCGATCAAGCGGGTGGTGGCGAACCAGGCGGACATCCAGCGC	477
	* * * * *	
Copenhageni	T-CA--TGAGAATTATTCTCATTCTTTGATAATACATCTTCTGCCGCCAAAGAGATGT	448
Lai	T-CA--TGAGAATTATTCTCATTCTTTGATAATACATCTTCTGCCGCCAAAGAGATGT	448
Hardjobovis	T-CA--TGAGAATCATCATTCTCAGTTTGTGATACTACCTCTTCTCAGCAAAAAGAAATGC	454
Patoc	T-CA--TGCGCATCGTCCATTCTCAGTTTGTGATAAAAACAACGTCAGAAGCAAAAAGAAATGA	451
Ecoli	T-CGGCTGGAAGCGGATTTCCATCAGAATACCGGTGAGTCGCAACAGATTGCGCAGGATA	238
Ps	TACACCGTCGAGTTCTTCCGCTGGCCCGCTCGGTTCAGCGGCCACCTCGCCGGACCGAG	537
	* * * * *	

Figura 10. Continua. Alineación de las secuencias nucleotídicas de *gspE*

Copenhageni	TAAATGAGATG-GAGGGGAAGTTTTCCGAACTTGC	CGGAAGCCTTTGAAAAATGAAA---CC	504
Lai	TAAATGAGATG-GAGGGGAAGTTTTCCGAACTTGC	CGGAAGCCTTTGAAAAATGAAA---CC	504
Hardjobovis	TAAATGAAATG-GAGGGGAAGTTTTCCGAACTTGC	CGGAAGCCTTTGAAAAATGAAA---CT	510
Patoc	TGGATGAGATG-GATGGAAGTTTCCGAGATCTCT	CCGATGCCTTCCGAATCCGACG---CA	507
Ecoli	TCGATCAATCC-GTCGATCTTCTCTCGCTTTCG	GGAAGAGATGCCCGCAAAATGAAGATCTC	297
Ps	AAGATCAGCGCGTCGGCAACTTCGAGCAGTTGCT	CAACCTCGGC	CGCCGACCCAGGAG 597
	** * * * * *	* * *	
Copenhageni	CTGGATCTAAGCGATGACGCTCCGATCATCAAAT	GGTCAACGTGATCCTTTCCCAAGCG	564
Lai	CTGGATCTAAGCGATGACGCTCCGATCATCAAAT	GGTCAACGTGATCCTTTCCCAAGCG	564
Hardjobovis	CTAGATTTAAGCGACGACGCCCTATCATCAAAT	GGTAAATGTGATTCTTTCCGAGGCC	570
Patoc	CTCGATCTCTAAGCAAGCACCATCATCAAGAT	GGTAAATGTGATTCTTTCCGAGGCC	567
Ecoli	CTGAATGAAGATTGAGCGGCACCGGTTATCCG	CTTGATCAATGCGATTTTGAGTGAGGCC	357
Ps	CCGGAC---GCCAACGACGCGCACATCGTCA	CCATCGT	CGACTGGCTGTTCCAGTACGCC 654
	* * * * * * * * * * * *	* * * * * * * * * * * *	
Copenhageni	GTCAACGAAAGGGCTTCGGATATTCACATTGA	ACCTTACGAAAAGTCTCTCGTGGTTCGC	624
Lai	GTCAACGAAAGGGCTTCGGATATTCACATTGA	ACCTTACGAAAAGTCTCTCGTGGTTCGC	624
Hardjobovis	GTCAACGAAAGAGCTTCGACATTCACATCGAG	CCGTATGAAAAGTCACTCGTGGTTCGT	630
Patoc	GTGTCGAGCGCGCTTCGGATATCCACATCGA	ACCATTGAAAAATCTGTCATCGTTCGG	627
Ecoli	ATCAAGAAGCCGCTCTGATATCCACATGAA	ACCTATGAAAAACAATGTCGATCCGT	417
Ps	TTCCAGCAGCGCGCGCACATCCACATCGAG	CCGCGCCGCGAGCAGGGCACCGTCCGC	714
	* * * * * * * * * * * *	* * * * * * * * * * * *	
Copenhageni	TATCGTGTGGATGGTATTTGCATAACGTGCT	TAGTCCCTCCTAAATCGTATCAGCGGGT	684
Lai	TATCGTGTGGATGGTATTTGCATAACGTGCT	TAGTCCCTCCTAAATCGTATCAGCGGGT	684
Hardjobovis	TACAGGGTGGATGGTATTTGCATAACGTTC	TAGTCCCTCCTAAATCGTATCAGCGGGT	690
Patoc	TATCGTGTGGATGGTATTTGCATAACGTTC	TAGTCCCTCCTAAATCGTATCAGCGGGT	687
Ecoli	TTTCGCATCGACGGCGTTTTCGGACAATTT	TACGCCAAACAAAAAACTGGCGGCACTG	477
Ps	TTCCGTATCGACGGCGTGTGCACAACGTCT	ACCAGTTC	CCGCGCCGAGGTGACCATGGCG 774
	* * * * * * * * * * * *	* * * * * * * * * * * *	
Copenhageni	ATTTCTTCCAGAATCAAGATCATGTCTAATTT	GAAACATCGCTGAAAATAGACTTCCTCAA	744
Lai	ATTTCTTCCAGAATCAAGATCATGTCTAATTT	GAAACATCGCTGAAAATAGACTTCCTCAA	744
Hardjobovis	ATTTCTTCCAGGATCAAGATCATGTGCAATCT	GAAATATCGCAGAGAATCGACTTCCTCAA	750
Patoc	ATTTCCACTCGTATTAATATGTCGAATCT	CAATATGCGGAAAATAGGCTCCCGCAA	747
Ecoli	CTTATCTCCGAATTAAGGTCATGGCTCGTCT	TGATATCGCCGAAAACGATTTCCACAG	537
Ps	GTGGTCAGCCCGCTGAAGTCTGGGACGGAT	GAAACGTGGCGGAGAAAACGCAAGCCGAG	834
	* * * * * * * * * * * *	* * * * * * * * * * * *	
Copenhageni	GACGGAAGGATCAA-ACTTAGATTG--GCTGGT	AAGGATATAGATATCCGGGTTTCCACC	801
Lai	GACGGAAGGATCAA-ACTTAGATTG--GCTGGT	AAGGATATAGATATCCGGGTTTCCACC	801
Hardjobovis	GACGGGAGAATTAA-GCTCAGACTT--GTTGGA	AAAGGACATCGATATCCGGGTTTCTACG	807
Patoc	GATGGTAGAATTAA-ACTAAGATTA--GCTGGT	AAAGACGTGGATGTCAGGGTTTCCATC	804
Ecoli	GATGGAAGAATTAG-TTTGCGTATC--GGCG	ACGTAACATAGATGTCGCGTATCCACA	594
Ps	GACGGCCGGGTCAAGCAAGACCCCGGAGCG	CGCCGAGGTGGAGCTGCGCCTGTCCGAC	894
	** * * * * * * * * * * *	** * * * * * * * * * * *	
Copenhageni	ATTCCTTGTCAAGTTCGGAGAACGGATCGTAA	TGAGGCTTTTGAATAAAACGGATCAAAA	861
Lai	ATTCCTTGTCAAGTTCGGAGAACGGATCGTAA	TGAGGCTTTTGAATAAAACGGATCAAAA	861
Hardjobovis	ATTCCTTGTCAAGTTCGGAGAACGGATCGT	TATGAGGCTTTTGAACAAAACGGATCAAAA	867
Patoc	ATCCCATGCCAATTCGGCGAACGAATGTAA	TGAGGATTTTGAATAAAACGGACAAA	864
Ecoli	CTGCCCTCATCTATGGTGAACGCGCGTACT	CCGCTGCTGGATAAAAACAGCCTCCAG	654
Ps	CTGCCACCGCCTTCGGCGAGAAGATGGT	GATGCGCATCTTCGACCCCGAGGTGCTG	954
	* * * * * * * * * * * *	* * * * * * * * * * * *	
Copenhageni	TATTCCTTAGATACGATGGGTTTTTATCCAGA	ATTAATCCAGTCTTTGCGTTGTTAATT	921
Lai	TATTCCTTAGATACGATGGGTTTTTATCCAGA	ATTAATCCAGTCTTTGCGTTGTTAATT	921
Hardjobovis	TATTCCTTAGATACGATGGGTTTTTATCCCG	ATCTCATCAAATCGCTTCGTTCTCTAATC	927
Patoc	TATTCCTTAGATACGATGGGTTTTTAA	CCCTCAAATCTTAAAGAAATCAAAGAACTCATT	924
Ecoli	CTTTCATTGAACAACCTGGGATGACGGC	AGCGGATAAGCAGGATTTAGAAAATCTCATT	714
Ps	AAGAGCTTCGACCCAGCTCGGCTTCTCCG	CCGACGACCTGCGCGCTGGCAGGATGACC	1014
	* * * * * * * * * * * *	* * * * * * * * * * * *	
Copenhageni	TACGAACCTCATGGAATCATTTTAGTAACGGG	ACCGGACCGGATCGGGTAAAGTCTACTACA	981
Lai	TACGAACCTCATGGAATCATTTTAGTAACGGG	ACCGGACCGGATCGGGTAAAGTCTACTACA	981
Hardjobovis	TACGAACCTCATGGAATCGTTCTCGTTACGGG	ACCGGATCGGGAAAATCCACCACA	987
Patoc	TATAAACCTATCGGAATCATACTGTGACGGG	TCTACGGGATCTGGTAAATCAACCAT	984
Ecoli	CAGCTCCGACCGTATTATCCTGGTGACAGG	CGCGACAGGCTCCGGTAAAAGCACCCAG	774
Ps	AGCCAGCCCAACGGCATCATCTGGTCA	CCGCCCCACCGGCTCGGGCAAGACCACCG	1074
	** * * * * * * * * * * *	** * * * * * * * * * * *	
Copenhageni	TTATATTCTGCGTTAAGCGAACTCAATACAGA	AAGAAACATCATCACTGCGAAGAT	1041
Lai	TTATATTCTGCGTTAAGCGAACTCAATACAGA	AAGAAACATCATCACTGCGAAGAT	1041
Hardjobovis	CTCTATTCTGCGCTCAGCGAACTGAACACAG	AAGAAACATCATCACTGCGAAGAT	1047
Patoc	CTCTATTCTGCTTTATCTGAGATCAATACAG	AAGAAACATCATCACTGCGAAGAT	1044
Ecoli	CTCTACGCCATCCTTTCCGCGCTGAATACT	CCCGCGCAATATTCTGACGGTAGAAGAT	834
Ps	CTCTACCCAGCTCAAGCACTGGCCACCGAT	GAGGTGAACGTCTGCACCATCGAGGAC	1134
	* * * * * * * * * * * *	* * * * * * * * * * * *	

Figura 10. Continua. Alineación de las secuencias nucleotídicas de *gspE*

Copenhageni	CCTGTGGAATATCAGATTGAAGGAATTC-TCAAATGCAAATGCAGGAAAAAATGGTCT	1100
Lai	CCTGTGGAATATCAGATTGAAGGAATTC-TCAAATGCAAATGCAGGAAAAAATGGTCT	1100
Hardjobovis	CCCGTAGAGTATCAGATCGAAGGAATTC-TCAGATGCAAATGCAGGAGAAAAATCGGTCT	1106
Patoc	CCAGTGAATACCAAATGGATGGAATTC-CCAAATGCAGATGAAACGATAAAAATGGACT	1103
Ecoli	CCCGTGAATATGAGCTGGAAGGCATTGG-GCAAACGCAGGTGAATACCCGTGTGGATAT	893
Ps	CCGATCGAG-ATGATCGAGCCCTCGTTCACCCAGATGCAGGTCCAGCACACATCGACCT	1193
	** *	
Copenhageni	TACGTTTGCAACCGGACTTCGAGCCATCCTTCGACAAGACCCGGACGTTATCATGGTAGG	1160
Lai	TACGTTTGCAACCGGACTTCGAGCCATCCTTCGACAAGACCCGGACGTTATCATGGTAGG	1160
Hardjobovis	TACGTTTGCTACCGGTTTAAGAGCGATCTTACGACAAGACCCGGATGTGATTATGGTGGG	1166
Patoc	TACATTTGCAGCAGGACTTCGTTCCATTTTACGACAAGATCCGGACGTAGTAATGGTGGG	1163
Ecoli	GTCTTTGCTCGCGGCCTGCGCGCCATACTTCGCCAGGACCCGGATGTGTCATGGTGGG	953
Ps	GACCTTCGCCAGCGCGTACGCGCCCTGCTGCGGCAGGACCCGGACATCATCATGGTGGG	1253
	* *	
Copenhageni	TGAGATTGAGATGAAGAAACCGCAAGAAATCGCGATCCAAGCTTCTCTGACCGGTCACT	1220
Lai	TGAGATTGAGATGAAGAAACCGCAAGAAATCGCGATCCAAGCTTCTCTGACCGGTCACT	1220
Hardjobovis	GGAGATTGAGATGAGGAAACCGCGAGGATCGCGATCCAAGCTTCTCTGACCGGTCACT	1226
Patoc	GGAGATCCGGGATGAGGAAACAGCAAGGATTGCCATCCAAGCTTCCCTAACAGGTCACT	1223
Ecoli	GGAAATTCGTGATACAGAAACCGCGCAGATTGCGGTTGAGGCTCGCTCACCGGCCATCT	1013
Ps	AGAGATCCGGGACTGGAGACCGCGAGATGGCGATCCAAGCGCGCTCACCGGCCACT	1313
	* *	
Copenhageni	TGTTTTTTCTACGCTTACACAAAACGATGCAGCAAGTCCCGGACTCGTTTGATCGATAT	1280
Lai	TGTTTTTTCTACGCTTACACAAAACGATGCAGCAAGTCCCGGACTCGTTTGATCGATAT	1280
Hardjobovis	TGTGTTTTCCACATTGCATACGAAACGACGCGGCCAGTCCGGGACTCGTTTGATCGATAT	1286
Patoc	GGTATTTTCAACCTTACACACCAATGACGCATCCTCAGCAGTGACAAGGCTTGTGGATAT	1283
Ecoli	GGTACTCTCAACACTCCACACTAACAGTGCATCAGGCGCAGTGACCCGGCTCCGCGACAT	1073
Ps	GGTCTCTCCACCTGACACCAACGACTCCCCACGGCGATCACCCGCTGCTCGCAACT	1373
	* *	
Copenhageni	GGGAATCGAGCCCTATCTGATTACTTCCACAGTATTAGGATTTATGGCTCAAAGACTTGT	1340
Lai	GGGAATCGAGCCCTATCTGATTACTTCCACAGTATTAGGATTTATGGCTCAAAGACTTGT	1340
Hardjobovis	GGGAATCGAACCCTATCTTATCACTTCCACGGTTTTGGGTTTTATGGCTCAGAGACTTGT	1346
Patoc	GGGTATTGAACCATATCTCATCAGAGTTCGTATTAGGTTTTATGGCAAAAAGGCTTGT	1343
Ecoli	GGGCGTCGAATCATTCTGCTTTCGTCTTCCCTGGCAGGGATTATCGCGCAACGTCTGGT	1133
Ps	GGGCGTACCCTACTACTGATCCGCGCCAGGCTAGGGGCTAGGGGCTAGGGGCTAGGGGCT	1433
	* *	
Copenhageni	AAGAGTTATCTGCACTCAATGTAAAGAAAACGTATAAACTACCCTCGGAACTAGAGTC	1400
Lai	AAGAGTTATCTGCACTCAATGTAAAGAAAACGTATAAACTACCCTCGGAACTAGAGTC	1400
Hardjobovis	ACGTGTCATCTGCACTCAATGTAAAGAGATTTACAAAACCCACCGCTTCGGAATTGGAATC	1406
Patoc	TGCTGTGATTGTAAAGGATTGTAATACTTCTTACAAAACCAACTGACAAAAGATTTGGCGGG	1403
Ecoli	TGCTCGCCTGTGTCCGCAATGCCGA-CAATTACGCCCCGATCACCCCAACAGCGCAGA	1192
Ps	GCGCACGCTCTGCCCACTGCAAGGCG-CCGATGCAACTGGCGGACAGCGATGCGACG	1492
	* *	
Copenhageni	CATTGGCAT-CTCTAAAAAATTTTTAAAGAACGGTAACTTACATCGTGGTAAAGGTTGTT	1459
Lai	CATTGGCAT-CTCTAAAAAATTTTTAAAGAACGGTAACTTACATCGTGGTAAAGGTTGTT	1459
Hardjobovis	GATTGGAAT-TTCTAGGAAGGCTTTAAAAAACGGAAGCTTACACAGAGGTAAGGTTGTT	1465
Patoc	ACTTGGAAAT-CCAAAGAAAAGAACTAAAAAATGGGGTTTTGTACCGCGGAAAAGGTTGTA	1462
Ecoli	TGTTTTAAAT-ATC--ATCAGCTCGCGGTGACAACAATTGGCACTCCCGTA--GGCTGCC	1246
Ps	AACTGACCCGCTGGAGCGCCCGCGCCAGCGGCGCGCACAGGCGGTGGGTTGCC	1552
	* *	
Copenhageni	CTCATTGTATGGGAACTGGTTTTAAAGGTAGAATCGGAATTTATGAACTTTACTTGTAA	1519
Lai	CTCATTGTATGGGAACTGGTTTTAAAGGTAGAATCGGAATTTATGAACTTTACTTGTAA	1519
Hardjobovis	CTCATTGTATGGGAAACCGGTTTTAAAGGAAGAACGGGAATCTACGAACTTTTGTAGTGA	1525
Patoc	GCTCTGTCTCAATTTCAGGTTACAAGGGAACGAACTGGTCTATACGAACTCCTTACCATGA	1522
Ecoli	CTCATTGCCATCAATCCGGCTATCAGGCGCGCATGGCGATCCACGAAATGATGTTGTTGA	1306
Ps	TGGAGTGCCGCGACACCGGCTATCGCGGGCGCGCGGCGTCTATGAAATCATGCTGCTCA	1612
	* *	
Copenhageni	ATTCTCCTCTCAAACAAGCAATTTCTCATGGTAAAGACGCTGGACAGTTAAACGAAATCG	1579
Lai	ATTCTCCTCTCAAACAAGCAATTTCTCATGGTAAAGACGCTGGACAGTTAAACGAAATCG	1579
Hardjobovis	ATTCTCACATTAACATGCGATCCTGCAAGGTAAGGATGCGGGTCAGTTAAACGAGATCG	1585
Patoc	ACGATGAAATCAAACGCGCTATTTTACAAGGTGCGGATGCCAATCGCATCAAAGAACTTG	1582
Ecoli	-CGCCGGAATP--ACGGGCGCTAATTCATGAAAATGTGGATGAAACAAGCACTGGAGCGAC	1363
Ps	GCGATAGCCTGAAAGAAGTATCACCGCGACACCGACCTAGTCGCCCTGCGCCCGAGG	1672
	* *	
Copenhageni	CTCTCGAGCATGGGTTTCGAACTCTTAAAGATTACGGAATTAGAAAAGGTAGTTGATGGTG	1639
Lai	CTCTCGAGCATGGGTTTCGAACTCTTAAAGATTACGGAATTAGAAAAGGTAGTTGATGGTG	1639
Hardjobovis	CGCTCGAACATAATTTCCAACTCTAAAGATTACGGAGTCAAAAAGGTAACTCGACGGAG	1645
Patoc	CCGTTAAAAATGGACTATCTGTCTTCAAGAAATGTTAAGTACAAAGTATCGAGGGAG	1642
Ecoli	TAGTCCGGCAACAACAAGGCTTAATCAAAAATGGCTGCAAAAAGTATAAGCGGTG	1423
Ps	CGTACAAGGAAGGCACCCGCGCCTGCGCCTGTCCGGCGCGCAGAAGGTGCGCCGAGGTA	1732
	* *	
Copenhageni	TAACTACAATCGACGAAGTCTCAGGGTAACTTAA-----	1674
Lai	TAACTACAATCGACGAAGTCTCAGGGTAACTTAA-----	1674
Hardjobovis	TAACTACGATCGACGAAGTCTCAGAGTAAC-----	1676
Patoc	TGACAACTCCTGAAGAAGTCTTCCGGTATCTTAA-----	1677
Ecoli	ACACCTCCTGGGATGAGGTTATGCGCTCGCCAGTGCCACGCTGGAGAGCGAAGCATGA	1482
Ps	TCAGTACGCTGGAGGAAGTACTGCGGGTGACCCCGCAGAGCGAACAGAAGTAG-----	1785
	* *	

Adicionalmente, se obtuvo la secuencia parcial del gen *gspC*, completando aproximadamente 41.36% de su longitud (376/909 pb) y río abajo, se obtuvo la secuencia parcial del gen *gspF* la cual se completó aproximadamente en 78.72% de su longitud (966/1,227 pb). En el Cuadro 6, se resume el número de pb de los genes de las 4 serovariedades.

Cuadro 6. Número de pares de bases de los genes *gspD* y *gspE* de leptospiras

Serovariedad	Gen (pb)			
	<i>gspC</i>	<i>gspD</i>	<i>gspE</i>	<i>gspF</i>
Patoc	(376) Parcial	1,788	1,677	(966) Parcial
Copenhageni	909	1,791	1,674	1, 227
Hardjobovis	903	1,794	1,671	1,224
Lai	909	1,848	1,674	1, 227

Número de pb de los genes *gspD* y *gspE* de la serovariedad Patoc, comparando con las serovariedades Copenhageni, Hardjobovis y Lai. Las secuencias de los genes *gspC* y *gspF* de la serovariedad Patoc son parciales.

7.3 Identificación de los genes del *loci gsp* de *L. biflexa* serovariedad Patoc

La identidad de las secuencias se obtuvo por medio de los programas en línea BLAST y ClustalW. Se realizó una alineación por medio del programa BLASTn (nucleótido- nucleótido) con la secuencia de *gspD* de la serovariedad Patoc con el banco de datos del Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI). La secuencia de nucleótidos alineó con los homólogos en las serovariedades Copenhageni y Lai, las alineaciones entre estas serovariedades dieron como resultado tres fracciones de secuencia menores de 62 pb, con identidades de 82.0 88.0 y 92.0% (Cuadro 7). Tres alineaciones más que corresponden a fragmentos menores de 25 pb de genes en *Campylobacter* que no están relacionados con sistemas de secreción bacteriana.

Al buscar homólogos en el banco de datos del NCBI para la secuencia de *gspE* de la serovariedad Patoc se encontraron alineaciones con dos fragmentos menores a 215 pb que corresponden al homólogo en las serovariedades Copenhageni y Lai con una identidad del 82.0%, más una alineación de 25 pb que corresponde a un cósmido (*Caenorhabditis elegans*, Y73B6BL) no relacionado con sistemas de secreción (Cuadro 7).

Cuadro 7. Porcentaje de identidad nucleótido-nucleótido observada entre *gspD* y *gspE* de Patoc con sus homólogos en leptospiras

Identidad (BLAST)	Patoc <i>gspD</i>	Patoc <i>gspE</i>
Copenhageni	A 88.0% (55/62)	A 82.0% (177/215)
	B 92.0% (38/41)	y (131/159)
	C 82.0% (62/75)	
Lai	A 88.0% (55/62)	A 82.0% (177/215)
	B 92.0% (38/41)	y (131/159)
	C 82.0% (62/75)	

Porcentaje de identidad nucleótido-nucleótido observada entre *gspD* y *gspE* de Patoc con los homólogos en el banco de datos del National Center for Biotechnology Information El análisis fue realizado mediante el programa BLASTp. A, B y C = distintos fragmentos resultado de la alineación por dicho programa.

Al realizar un análisis de la secuencia codificada de aminoácidos (aa) por medio del programa BLASTp (proteína), se encontró que la secuencia de 595 aa de GspD, alineó con secuencias de otras varias especies bacterianas.

Las dos primeras con las que tuvo mayor homología (identidad de 63.0%), fueron con las serovariedades Copenhageni y Lai. En otras bacterias incluyen a *E. coli* y *K. pneumoniae*, se observó que hay una homología que varía entre 27.0 a 28.0% (Cuadro 9). Por otro lado, se encontró que la secuencia de 558 aa de GspE alineó con sus homólogos en leptospiras patógenas,

con una homología (identidad) de 71.0% en las dos serovariedades y con otras especies bacterianas, donde su homología varió de 43.0 a 51.0% (Cuadro 8).

Adicionalmente, se alinearon las secuencias incompletas de los genes *gspC* y *gspF* de la serovariedad Patoc, por medio del programa BLASTn, los cuales no revelaron ninguna identidad significativa con sus genes homólogos en otras serovariedades de *Leptospira* ni con los genes de otras bacterias. Cabe mencionar que la secuencia parcial de *gspC* mostró identidad con un fragmento de 20 pb de una deshidrogenasa de *Campylobacter jejuni* y la secuencia de *gspF*, mostró identidad con un fragmento de 21 pb de una cinasa de *Enterococcus faecalis*. Las secuencias de aa codificadas analizadas mediante BLASTp revelaron, que estos fragmentos alinean con las serovariedades patógenas Copenhageni y Lai, mostrando una identidad de 72.0% (81/111) para GspC y de 64.0% (198/305) para GspF.

También se alinearon por separado las secuencias de *gspD* y *gspE* con dos distintos programas de alineación (BLASTn y ClustalW), así como de las proteínas codificadas, de la serovariedad Patoc de *I. biflexa* con la de los genes homólogos de leptospiros patógenas (Copenhageni, Hardjobovis y Lai). Las alineaciones nucleotídicas revelaron que hay identidad con distintos fragmentos, que muestran una identidad en Copenhageni y Lai que va de 72.0 a 88.0% en 4 distintos fragmentos, a diferencia de la serovariedad Hardjobovis, donde sólo alinearon dos fragmentos con identidad de 76.0 y 72.0% (Cuadro 9).

Cuadro 8. Identidad y similitud entre GspD y GspE de Patoc con los productos homólogos de las serovariedades patógenas de *Leptospira* y con otras bacterias.

Especie o serovariedad y nombre de la proteína	Identidad - Similitud con GspD de Patoc	Referencia	Número acceso
Copenhageni GspD	63.0% y 79.0% (355/559)	Nascimento <i>et al.</i> , 2004	YP001529
Lai GspD	63.0% y 79.0% (355/595)	Ren <i>et al.</i> , 2003	NP712556
<i>Syntrophus aciditrophicus</i> GspD	28.0% y 50.0% (155/553)	Gunsalus <i>et al.</i> , 2006	YP462274
<i>Shewanella</i> sp. GspD	28.0% y 49.0% (196/595)	Copeland <i>et al.</i> , 2005	EAN70781
<i>Colwellia psychrerythraea</i> GspD	28.0% y 48.0% (157/544)	Methe <i>et al.</i> , 2005	AAZ26931
<i>E. coli</i> (53638) PulD	31.0% y 50.0% (146/467)	NCBI Genomes Project	ZP00733932
<i>K. pneumoniae</i> PulD	28.0% y 47.0% (163/580)	d' Enfert <i>et al.</i> , 1989	AAA25126
<i>E. coli</i> (K-12) PulD	31.0% y 50.0% (146/467)	Blattner <i>et al.</i> , 1997	H65125
<i>Shewanella baltica</i> NolW-like	27.0% y 48.0% (165/600)	Copeland <i>et al.</i> , 2005	ZP00581049
<i>Shewanella putrefaciens</i> NolW-like	27.0% y 49.0% (172/622)	Copeland <i>et al.</i> , 2005	ZP00812677
Identidad – Similitud con GspE de Patoc			
Copenhageni GspD	71.0% y 88.0% (400/556)	Nascimento <i>et al.</i> , 2004	YP001530
Lai GspD	71.0% y 88.0% (400/556)	Ren <i>et al.</i> , 2003	AAN49573
<i>Syntrophus aciditrophicus</i> GspE	51.0% y 72.0% (251/487)	Gunsalus <i>et al.</i> , 2006	YP462275
<i>Desulfuromonas acetoxidans</i> GspE	45.0% y 68.0% (255/556)	Copeland <i>et al.</i> , 2005	ZP00551908
<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> GspE	47.0% y 67.0% (272/569)	Copeland <i>et al.</i> , 2005	ZP00401750
<i>Parachlamydia</i> sp. Proteína hipotética del SST-II	47.0% y 68.0% (252/526)	Horn <i>et al.</i> , 2004	CAF24621
<i>Geobacter sulfurreducens</i> PilB	44.0% y 67.0% (251/564)	Methe <i>et al.</i> , 2003	AAR34865
<i>G. metallireducens</i> GspE	44.0% y 67.0% (250/560)	Copeland <i>et al.</i> , 2005	ABB31627
<i>Pelobacter carbinolicus</i> PilB	43.0% y 68.0% (243/558)	Copeland <i>et al.</i> , 2005	ABA89388
<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> GspE	43.0% y 65.0% (249/572)	Copeland <i>et al.</i> , 2005	ZP00667978

Identities detectadas a la primera secuencia por medio del banco de datos del NCBI (BLASTp)

Cuadro 9. Identidad de los genes *gspD* y *gspE* de Patoc con sus homólogos en leptospiras patógenas mediante los programas BLASTn y ClustalW.

	Copenhageni Nascimento <i>et al.</i> , 2004	Hardjobovis Bulach <i>et al.</i> , Comunicación personal	Lai Ren <i>et al.</i> , 2003	Programa
Patoc <i>gspD</i>	A 75.0% (166/221)	A 76.0% (73/95)	A 75.0% (166/221)	BLAST n
	B 75.0% (39/184)	B 72.0% (128/177)	B 75.0% (139/184)	
	C 88.0% (55/62)		C 88.0% (55/62)	
	D 72.0% (189/259)		D 72.0% (189/259)	
	59.0% (1788/1791)	59.0% (1788/1794)	59.0% (1788/1848)	ClustalW
Patoc <i>gspE</i>	A 76.0% (310/407)	A 73.0% (417/567)	A 76.0% (310/407)	BLASTn
	B 74.0% (357/480)	B 73.0% (305/413)	B 74.0% (357/480)	
	66.0% (1677/1674)	66.0% (1677/1676)	66.0% (1677/1674)	ClustalW

Regiones de identidad de los genes *gspD* y *gspE* entre las serovariedades Patoc con Copenhageni, Hardjobovis y Lai. Las alineaciones se realizaron por separado con cada una de las serovariedades mediante los programas BLASTn y ClustalW. A, B, C y D = distintos fragmentos que alinearon en el programa BLAST

Las secuencias de las proteínas codificadas GspD y GspE de Patoc se alinearon con sus homólogos en leptospiras patógenas y con las bacterias Gram negativas. Al alinear las secuencias nucleotídicas de *gspD* y *gspE* de Patoc con 14 bacterias Gram negativas (*A. hydrophila*, *B. pseudomallei*, *E. chrysanthemi*, *E. carotovora*, *E. coli* K-12, *E. coli* O78:H11, *E. coli* Dysenteriae, *K. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *Ps. aeruginosa*, *Ps. putida*, *V. cholerae*, *X. campestris*, *Y. pestis*) no se encontraron identidades significativas (Cuadro 10). Las alineaciones de aminoácidos de GspD y GspE de Patoc con los homólogos de las leptospiras patógenas, mostraron una identidad aminoácido-aminoácido de 60 a 62% con GspD y de 71 a 72% con GspE. En contraste, las alineaciones con el grupo de 14 bacterias Gram negativas con las secuencias de Patoc revelaron que existe una identidad de sólo 20 a 28% con GspD y una identidad ligeramente más elevada con GspE, de 30 a 48% (Cuadro 10).

Cuadro 10. Porcentajes de identidad y similitud entre GspD y GspE de la serovariedad Patoc con sus homólogos en serovariedades de *Leptospira* y 14 bacterias Gram negativas

Bacterias	GspD		GspE	
	BLASTp identidad - similitud	ClustalW	BLASTp identidad/ similitud	ClustalW
Copenhageni * GspDE	62.0% - 78.0% (366/587)	61.0%	71.0% - 88.0% (400/556)	71.0%
Hardjobovis * GspDE	61.0% - 78.0% (363/591)	60.0%	72.0% - 88.0% (405/556)	72.0%
Lai * GspDE	62.0% - 78.0% (366/587)	61.0%	71.0% - 88.0% (400/556)	71.0%
<i>A. hydrophila</i> ExeDE	25.0% - 45.0% (161/632)	25.0%	47.0% - 71.0% (210/443)	42.0%
<i>B. pseudomallei</i> GspDE	24.0% - 42.0% (162/654)	26.0%	47.0% - 67.0% (208/434)	41.0%
<i>E. chrysanthemi</i> OutDE	25.0% - 43.0% (170/659)	26.0%	47.0% - 70.0% (204/432)	41.0%
<i>E. carotovora</i> OutDE	27.0% - 47.0% (164/600)	25.0%	45.0% - 69.0% (203/446)	40.0%
<i>E. coli</i> 78:H11 GspDE	27.0% - 48.0% (147/533)	24.0%	45.0% - 69.0% (211/461)	41.0%
<i>E. coli</i> K-12 GspDE	27.0% - 48.0% (171/615)	26.0%	48.0% - 69.0% (206/423)	41.0%
<i>K. pneumoniae</i> PulDE	28.0% - 48.0% (167/580)	25.0%	47.0% - 71.0% (206/436)	40.0%
<i>L. pneumophila</i> LspDE	21.0% - 39.0% (139/659)	21.0%	45.0% - 67.0% (204/451)	41.0%
<i>Ps. aeruginosa</i> PulDE	25.0% - 45.0% (164/636)	26.0%	39.0% - 59.0% (195/491)	33.0%
<i>Ps. putida</i> PulDE	26.0% - 46.0% (141/539)	21.0%	37.0% - 58.0% (186/490)	30.0%
<i>E. coli</i> Dysenteriae GspDE	28.0% - 48.0% (149/529)	23.0%	45.0% - 68.0% (211/461)	40.0%
<i>V. cholerae</i> EpsDE	27.0% - 45.0% (172/624)	26.0%	53.0% - 73.0% (208/391)	48.0%
<i>X. campestris</i> XpsDE	27.0% - 46.0% (86/312) 20.0% - 44.0% (37/177)	21.0%	40.0% - 61.0% (196/483)	34.0%
<i>Y. pestis</i> GspDE	26.0% - 47.0% (161/597)	24.0%	46.0% - 66.0% (206/442)	40.0%

Resultados en porcentaje obtenidos mediante los programas BLAST y ClustalW de las similitudes de GspD y GspE de Patoc. Serovariedades de *Leptospira* (*).

Adicionalmente, se realizó una alineación global mediante el programa ClustalW con las secuencia de aa de GspD y GspE de leptospiras y 14 bacterias Gram negativas, con la finalidad de determinar las identidades entre éstas secuencias (Cuadros 11 y 12).

La identidad que existe entre GspD de leptospiras patógenas es de 91.0%, entre Copenhageni y Hardjo o Lai y Hardjo; la identidad entre Copenhageni y Lai es de 100%, las identidades entre leptospiras y el grupo de 14 bacterias Gram negativas oscila entre 22.0 y 24.0%.

Cuadro 11 Porcentaje de identidad de GspD entre leptospiras patógenas y 14 bacterias Gram negativas

Serovariedades de <i>Leptospira</i>			Bacterias Gram negativas			
		aa		aa	Identidad %	
2	Copenhageni	596	3	Hardjo*	598	91
2	Copenhageni	596	4	Lai*	615	100
2	Copenhageni	596	7	<i>E chrysanthemi</i>	709	22
2	Copenhageni	596	8	<i>E coli</i> 078:H11	616	23
2	Copenhageni	596	9	<i>E coli</i> k12	650	23
2	Copenhageni	596	10	<i>E carotovora</i>	650	23
2	Copenhageni	596	11	<i>Klebsiella</i>	660	24
2	Copenhageni	596	12	<i>Legionella</i>	790	22
2	Copenhageni	596	14	<i>Ps putida</i>	591	24
2	Copenhageni	596	15	<i>E coli</i> Shigella	611	24
3	Hardjo	598	7	<i>E chrysanthemi</i>	709	21
3	Hardjo	598	8	<i>E coli</i> 078:H11	616	23
3	Hardjo	598	9	<i>E coli</i> k 12	650	22
3	Hardjo	598	10	<i>E carotovora</i>	650	23
3	Hardjo	598	11	<i>Klebsiella</i>	660	24
3	Hardjo	598	12	<i>Legionella</i>	790	22
3	Hardjo	598	14	<i>Ps putida</i>	591	24
3	Hardjo	598	15	<i>E coli</i> Shigella	611	24
4	Lai	615	7	<i>E chrysanthemi</i>	709	22
4	Lai	615	8	<i>E coli</i> 078:H11	616	22
4	Lai	615	9	<i>E coli</i> k12	650	22
4	Lai	615	10	<i>E carotovora</i>	650	23
4	Lai	615	11	<i>Klebsiella</i>	660	24
4	Lai	615	12	<i>Legionella</i>	790	21
4	Lai	615	14	<i>Ps putida</i>	591	24
4	Lai	615	15	<i>Shigella</i>	611	23

Resultados obtenidos mediante el programa ClustalW. * = serovariedades de *Leptospira*, *E. coli* Shigella = *E. coli* Shigella Dysenteriae.

Los resultados de las alineaciones de GspE entre leptospiros patógenos revelaron, que hay una homología (identidad aminoácido-aminoácido) de 94.0% cuando se comparó Hardjobovis con Copenhageni y Lai, la identidad entre éstas dos últimas fue de 100%. En el Cuadro 12, se muestran los resultados obtenidos mediante el programa ClustalW al ingresar las 14 secuencias codificadas de aa de GspE.

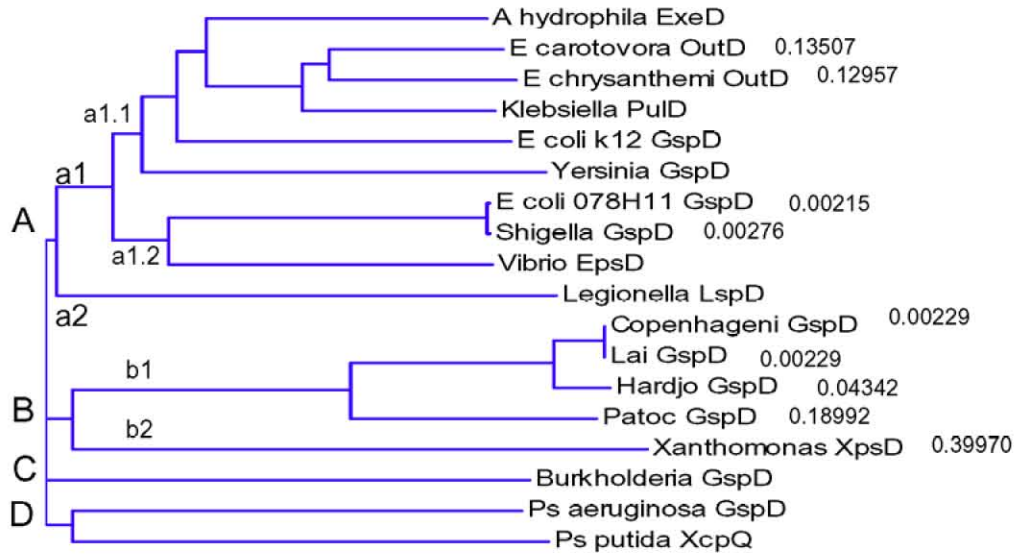
Cuadro 12. Porcentaje de identidad de GspE entre leptospiros patógenos y 14 bacterias Gram negativas

Serovariedades de <i>Leptospira</i>				Bacterias Gram negativas		
		aa		aa	Identidad %	
=====						
2	Copenhageni	557	3	Hardjobovis*	557	94
2	Copenhageni	557	4	Lai*	557	100
2	Copenhageni	557	5	<i>A hydrophila</i>	501	41
2	Copenhageni	557	6	<i>Burkholderia</i>	497	42
2	Copenhageni	557	7	<i>E coli</i> 078H11	497	43
2	Copenhageni	557	8	<i>E coli</i> K12	493	41
2	Copenhageni	557	9	<i>E carotovora</i>	498	43
2	Copenhageni	557	10	<i>E chrysanthemi</i>	498	42
2	Copenhageni	557	11	<i>Klebsiella</i>	497	42
2	Copenhageni	557	12	<i>Legionella</i>	494	41
2	Copenhageni	557	13	<i>Ps aeruginosa</i>	594	36
2	Copenhageni	557	14	<i>Ps putida</i>	556	32
2	Copenhageni	557	15	<i>Shigella</i>	497	43
2	Copenhageni	557	16	<i>V cholera</i>	418	49
2	Copenhageni	557	17	<i>Xanthomonas</i>	603	34
2	Copenhageni	557	18	<i>Yersinia</i>	503	41
3	Hardjobovis	557	5	<i>A hydrophila</i>	501	41
3	Hardjobovis	557	6	<i>Burkholderia</i>	497	43
3	Hardjobovis	557	7	<i>E coli</i> 078H11	497	44
3	Hardjobovis	557	8	<i>E coli</i> K12	493	41
3	Hardjobovis	557	9	<i>E carotovora</i>	498	42
3	Hardjobovis	557	10	<i>E chrysanthemi</i>	498	42
3	Hardjobovis	557	11	<i>Klebsiella</i>	497	43
3	Hardjobovis	557	12	<i>Legionella</i>	494	42
3	Hardjobovis	557	13	<i>Ps aeruginosa</i>	594	36
3	Hardjobovis	557	14	<i>Ps putida</i>	556	31
3	Hardjobovis	557	15	<i>Shigella</i>	497	43
3	Hardjobovis	557	16	<i>V cholera</i>	418	48
3	Hardjobovis	557	17	<i>Xanthomonas</i>	603	34
3	Hardjobovis	557	18	<i>Yersinia</i>	503	41
4	Lai	557	5	<i>A hydrophila</i>	501	41
4	Lai	557	6	<i>Burkholderia</i>	497	42
4	Lai	557	7	<i>E coli</i> 078H11	497	43
4	Lai	557	8	<i>E coli</i> K12	493	41
4	Lai	557	9	<i>E carotovora</i>	498	43
4	Lai	557	10	<i>E chrysanthemi</i>	498	42
4	Lai	557	11	<i>Klebsiella</i>	497	42
4	Lai	557	12	<i>Legionella</i>	494	41
4	Lai	557	13	<i>Ps aeruginosa</i>	594	36
4	Lai	557	14	<i>Ps putida</i>	556	32
4	Lai	557	15	<i>Shigella</i>	497	43
4	Lai	557	16	<i>V cholera</i>	418	49
4	Lai	557	17	<i>Xanthomonas</i>	603	34
4	Lai	557	18	<i>Yersinia</i>	503	41
=====						

Resultados obtenidos mediante el programa ClustalW. * = serovariedades de *Leptospira*. *Shigella* = *E. coli* *Shigella* *Dysenteriae*.

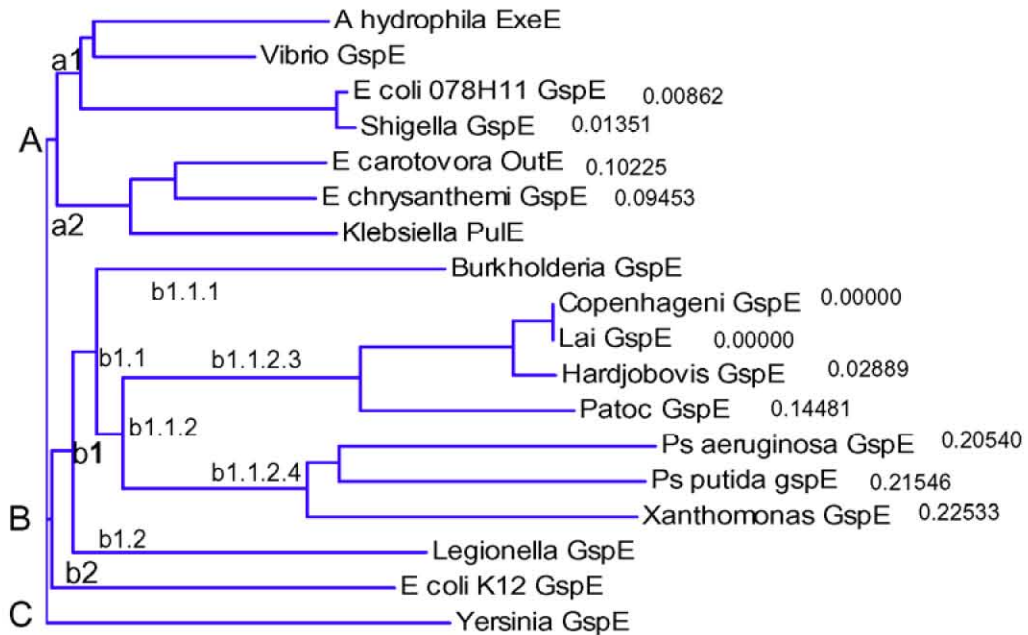
En las Figuras 11 y 12 se esquematizan los dendogramas de las proteínas GspD y GspE respectivamente entre 17 organismos (4 leptospiras y 14 Gram negativas), en ambos esquemas se puede apreciar que las proteínas son clasificadas en tres grupos A, B y

Figura 11. Dendograma con base en las homologías de GspD



Dendograma obtenido mediante el programa Vector TN1, al comparar las secuencias de aminoácidos correspondientes.

Figura 12. Dendograma con base en las homologías de GspE



Dendograma obtenido mediante el programa Vector TN1, al comparar las secuencias de aminoácidos correspondientes.

Adicionalmente, se alinearon las secuencias de GspD y GspE de la serovariedad Patoc con sus homólogos en leptospiros patógenos y con *E. coli* K-12, *E. coli* O78:H11, *K. pneumoniae*, *Ps. aeruginosa* y *V. cholerae* con la finalidad de apreciar regiones conservadas (Figuras 13 y 14). Por separado, se realizaron alineaciones con las secuencias de aminoácidos de GspD y GspE, de la serovariedad Patoc pero sólo con sus homólogos en leptospiros patógenos Copenhageni, Hardjobovis y Lai, esto con la finalidad de observar regiones conservadas entre leptospiros (Figuras 15 y 16). En alineaciones de leptospiros con 5 bacterias Gram negativas, se apreciaron más regiones conservadas (regiones señaladas con color rojo) en las secuencias de GspE que en las secuencias de GspD, donde se apreciaron solamente dos regiones constituidas por tres aa seguidos (GGL y NLM, del aa 628 al 677), región que mostró ser la más conservada entre leptospiros y 5 bacterias Gram negativas (Figura 13). En las secuencias de GspE la región conservada más grande está constituida por 10 aa (LVTGPTGSGK, del aa 352 al 362). Además, hay 11 regiones con tres o más aa idénticos que se aprecia a partir del aa 226 al 485 (Figura 14).

Las alineaciones con las secuencias de aminoácidos de GspD y GspE, de la serovariedad Patoc con sus homólogos en Copenhageni, Hardjobovis y Lai, revelaron regiones conservadas. En las alineaciones de GspD se apreciaron 47 regiones de 3 o más aa que son idénticos, en las secuencias de GspE se apreciaron 47 regiones de 3 o más aa que son idénticos (Figuras 15 y 16).

Cuadro 13. Marcos abiertos de lectura (MAL) que codifican para las proteínas que constituyen los *loci gsp*

Copenhageni	Lai	Hardjobovis	Patoc	<i>E. coli</i>
MAL A (559 aa) 42.0 – 64.0% Quelataasa Mg de <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> (211/495)	MAL A (494 aa) 42.0 – 63.0% Quelataasa Mg de <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> (210/494)	MAL A (286 aa) 41.0 -61.0% Quelataasa Mg de <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> (114/277)	(desconocido)	
MAL 1 (124 aa) 26.0- 50.0 % ATPasa de <i>Hahella chejuensis</i> (18/67)	MAL 1 (124 aa) 42.0 – 50.0 % ATPasa de <i>Hahella chejuensis</i> (210/494)	MAL 1 (124 aa) 26.0 – 50.0% ATPasa de <i>Hahella chejuensis</i> (18/67)	(desconocido)	<i>pioO</i>
MAL 2 (135 aa) 42.0 – 59.0% Peptidasa de <i>Treponema denticola</i> (79/187)	MAL 2 (336 aa) 42.0 – 59.0 % Peptidasa de <i>Treponema denticola</i> (79/187)	MAL 2 (336 aa) 41.0 – 59.0 % Peptidasa de <i>Treponema denticola</i> (82/198)	(desconocido)	GspA
MAL 3 (302 aa) 23.0 -45.0% GspC de <i>Geobacter sulfurreducens</i> (52/223)	MAL 3 (302 aa) 23.0 – 45.0% GspC de <i>Geobacter sulfurreducens</i> (52/223)	MAL 3 (301 aa) 25.0 – 47.0% GspC de <i>Geobacter sulfurreducens</i> (56/218)	(124aa) 32.0 – 59.0% GspC de <i>Geobacter sulfurreducens</i> (33/102)	GspC
MAL 4 (596 aa) 29.0 – 53.0 % GspD de <i>Syntrophus aciditrophicus</i> (156/537)	MAL 4 (615 aa) 29.0 – 53.0% GspD de <i>Syntrophus aciditrophicus</i> (156/537)	MAL 4 (598 aa) 30.0 – 54.0% GspD de <i>Syntrophus aciditrophicus</i> (163/542)	(595 aa) 28.0 -50.0% GspD de <i>Syntrophus aciditrophicus</i> (155/553)	GspD
MAL 5 (557 aa) 45.0 – 67.0% GspE de <i>Desulfuromonas acetoxidans</i> (253/556)	MAL 5 (557 aa) 45.0 - 67.0% GspE de <i>Desulfuromonas acetoxidans</i> (253/556)	MAL 5 (557 aa) 45.0 – 67.0% GspE de <i>Desulfuromonas acetoxidans</i> (251/556)	(558 aa) 51.0 – 72.0% GspE de <i>Syntrophus aciditrophicus</i> (251/487)	GspE
MAL 6 (408 aa) 35.0 – 60.0% GspF de <i>Deinococcus radiodurans</i> (146/407)	MAL 6 (408 aa) 36.0 – 60.0% GspF de <i>Syntrophus aciditrophicus</i> (148/410)	MAL 6 (408 aa) 35.0 – 61.0% GspF de <i>Deinococcus radiodurans</i> (146/407)	(322aa) 34.0 – 61.0% GspF de <i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> (99/306)	GspF
MAL 7 (158 aa) 44.0 – 59.0% GspG de <i>Polaromonas naphthalenivorans</i> (62/138)	MAL 7 (158 aa) 44.0 – 59.0% GspG de <i>Polaromonas naphthalenivorans</i> (62/138)	MAL 7 (173 aa) 41.0 – 57.0 % GspG de <i>Azoarcus</i> sp. (62/150)	(desconocido)	GspG
MAL 8 (189 aa) 25.0 – 44.0% GspH de <i>Geobacter metallireducens</i> (31/123)	MAL 8 (189 aa) 25.0 – 43.0% GspH de <i>Geobacter metallireducens</i> (31/123)	MAL 8 (189 aa) 28.0 – 58.0% GspH de <i>Geobacter metallireducens</i>	(desconocido)	GspH
MAL 9 (178 aa) 34.0 – 61.0% GspI de <i>Dehalococcoides</i> sp. (25/72)	MAL 9 (178 aa) 36.0 – 53.0% GspI de <i>Ralstonia metallidurans</i> (21/58)	MAL 9 (209 aa) 35.0 – 51.0% GspI de <i>Dehalococcoides</i> sp. (27/77)	(desconocido)	GspI
MAL 10 (214 aa) 39.0 – 55.0% GspG de <i>Azoarcus</i> sp. (24/61)	MAL 10 (214 aa) 23.0 – 48.0% GspJ de <i>Geobacter sulfurreducens</i> (44/189)	MAL 10 (212 aa) 21.0 – 47.0% GspJ de <i>Geobacter sulfurreducens</i> (41/189)	(desconocido)	GspJ
MAL 11 (391 aa)) 28.0 – 41.0% GspK de <i>Marinobacter aquaeolei</i> (49/171)	MAL 11 (458 aa) 28.0 – 41.0% GspK de <i>Marinobacter aquaeolei</i> (49/171)	MAL 11 (408 aa) 25.0 – 40.0% GspK de <i>Desulfuromonas acetoxidans</i> (83/328)	(desconocido)	GspK
MAL 12 (540 aa) 24.0 – 41.0 % PiIM de <i>Carboxydotherrmus hydrogenoformans</i> (83/341)	MAL 12 (540 aa) 24.0 – 41.0% PiIM de <i>Carboxydotherrmus hydrogenoformans</i> (83/341)	MAL 12 (541 aa) 25.0 – 44.0% PiIM de <i>Thermus thermophilus</i> (65/255)	(desconocido)	GspL
MAL 13 (175 aa) 38.0 – 51.0% Sintetasa y ligasa de <i>Ralstonia eutropha</i> (16/42)	MAL 13 (175 aa) 38.0 – 61.0% Sintetasa y ligasa de <i>Ralstonia eutropha</i> (16/42)	MAL 13 (175 aa) NH Proteína hipotética	(desconocido)	GspM
MAL 14 (313 aa) NH Proteína hipotética	MAL 14 (313 aa) NH Proteína hipotética	MAL 14 (308 aa) Proteína hipotética	(desconocido)	GspO
MAL 15 (247 aa) NH Proteína hipotética	MAL 15 (41 y 40 aa) NH Proteína hipotética	NP	(desconocido)	<i>bfr</i>
MAL 16 (75 aa) NH Proteína hipotética	MAL 16 (72 aa) 37.0 – 56.0% ATPasa de <i>Burkholderia fungorum</i> (19/51)	NP	(desconocido)	
MAL 17 (88 aa) 36.0 – 59.0% Ligasa de <i>Campylobacter fetus</i> (16/44)	MAL 17 (181 aa) 32.0 – 53.0% hidrogenasa de <i>Nocardia farcinica</i> (52/158)	NP	(desconocido)	
MAL D (200 aa) 29.0 51-0% Regulador transcripcional TetR de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (45/151)	MAL D (1,209 aa) 58.0 – 71.0 % Reductasa Ribonucleasa de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (909/1265)	MAL D (101 aa) 54.0 – 70.0% Transposasa de <i>Porphyromonas gingivalis</i> (48/88)	(desconocido)	

Marcos abiertos de lectura (MAL) que codifican para las proteínas que constituyen los *loci gsp* de las serovariedades Copenhageni, Hardjobovis, Lai y Patoc; con sus homólogos de las distintas proteínas del NCBI. En la serovariedad Hardjobovis sólo consta de 14 MAL a diferencia Copenhageni y Lai que están constituidos por 17 MAL. Adicionalmente y de forma comparativa, se muestra en la última columna el *locus gsp* en *Escherichia coli* K-12 (NCBI). Cada celda contiene la información: número del MAL con base en el lugar que ocupa en el *locus*; número aminoácidos (aa) de la proteína; porcentaje de identidad seguido del porcentaje de similitud de la proteína; nombre de la proteína con la que hubo identidad; entre paréntesis el número (aa) que alinearon; género y especie de la bacteria con la que hubo identidad. MAL A = el MAL antes del *locus gsp*; MAL D = el MAL después del *locus gsp*; NH = no se encontró homólogo NP = gen no presente en el *loci*.

Figura 13. Continua. Alineación de aminoácidos de GspD de la serovariedad Patoc con sus homólogos en leptospiras y 5 Gram negativas.

		50	100	
<i>E. coli</i> 078H11 Gspd (1)	---	---	---	---
<i>E. coli</i> k12 Gspd (1)	---	---	---	---
<i>Klebsiella</i> Puld (1)	---	---	---	---
<i>Ps. aeruginosa</i> Gspd (1)	---	---	---	---
<i>Vibrio</i> Epsd (1)	---	---	---	---
<i>Copenhageni</i> Gspd (1)	---	---	---	---
<i>Hardjo</i> Gspd (1)	---	---	---	---
<i>Lai</i> Gspd (1)	---	---	---	---
<i>Patoc</i> Gspd (1)	---	---	---	---
Consensus (1)	---	---	---	---
		150	200	
<i>E. coli</i> 078H11 Gspd (23)	---	---	---	---
<i>E. coli</i> k12 Gspd (76)	---	---	---	---
<i>Klebsiella</i> Puld (78)	---	---	---	---
<i>Ps. aeruginosa</i> Gspd (101)	---	---	---	---
<i>Vibrio</i> Epsd (75)	---	---	---	---
<i>Copenhageni</i> Gspd (48)	---	---	---	---
<i>Hardjo</i> Gspd (49)	---	---	---	---
<i>Lai</i> Gspd (67)	---	---	---	---
<i>Patoc</i> Gspd (47)	---	---	---	---
Consensus (101)	---	---	---	---
		250	300	
<i>E. coli</i> 078H11 Gspd (120)	---	---	---	---
<i>E. coli</i> k12 Gspd (172)	---	---	---	---
<i>Klebsiella</i> Puld (174)	---	---	---	---
<i>Ps. aeruginosa</i> Gspd (189)	---	---	---	---
<i>Vibrio</i> Epsd (171)	---	---	---	---
<i>Copenhageni</i> Gspd (136)	---	---	---	---
<i>Hardjo</i> Gspd (137)	---	---	---	---
<i>Lai</i> Gspd (155)	---	---	---	---
<i>Patoc</i> Gspd (131)	---	---	---	---
Consensus (201)	---	---	---	---
		350	400	
<i>E. coli</i> 078H11 Gspd (211)	---	---	---	---
<i>E. coli</i> k12 Gspd (265)	---	---	---	---
<i>Klebsiella</i> Puld (268)	---	---	---	---
<i>Ps. aeruginosa</i> Gspd (278)	---	---	---	---
<i>Vibrio</i> Epsd (263)	---	---	---	---
<i>Copenhageni</i> Gspd (225)	---	---	---	---
<i>Hardjo</i> Gspd (226)	---	---	---	---
<i>Lai</i> Gspd (244)	---	---	---	---
<i>Patoc</i> Gspd (218)	---	---	---	---
Consensus (301)	---	---	---	---

Figura 14. Continua. Alineación de aminoácidos de GspE de la serovariedad Patoc con sus homólogos en leptospiras y 5 Gram negativas.

		1	50	51	100
<i>E. coli</i> 078H11 GspE	(1)	---	---	---	---
<i>E. coli</i> K12 GspE	(1)	---	---	---	---
<i>Klebsiella</i> Pule	(1)	---	---	---	---
<i>Ps. aeruginosa</i> GspE	(1)	---	---	---	---
<i>Vibrio</i> GspE	(1)	---	---	---	---
Copenhageni GspE	(1)	---	---	---	---
Hardjobovis GspE	(1)	---	---	---	---
Lai GspE	(1)	---	---	---	---
Patoc GspE	(1)	---	---	---	---
Consensus	(1)	---	---	---	---
<i>E. coli</i> 078H11 GspE	(28)	---	---	---	---
<i>E. coli</i> K12 GspE	(18)	---	---	---	---
<i>Klebsiella</i> Pule	(24)	---	---	---	---
<i>Ps. aeruginosa</i> GspE	(95)	---	---	---	---
<i>Vibrio</i> GspE	(1)	---	---	---	---
Copenhageni GspE	(87)	---	---	---	---
Hardjobovis GspE	(87)	---	---	---	---
Lai GspE	(87)	---	---	---	---
Patoc GspE	(88)	---	---	---	---
Consensus	(101)	---	---	---	---
<i>E. coli</i> 078H11 GspE	(107)	---	---	---	---
<i>E. coli</i> K12 GspE	(98)	---	---	---	---
<i>Klebsiella</i> Pule	(104)	---	---	---	---
<i>Ps. aeruginosa</i> GspE	(195)	---	---	---	---
<i>Vibrio</i> GspE	(23)	---	---	---	---
Copenhageni GspE	(167)	---	---	---	---
Hardjobovis GspE	(167)	---	---	---	---
Lai GspE	(167)	---	---	---	---
Patoc GspE	(168)	---	---	---	---
Consensus	(201)	---	---	---	---
<i>E. coli</i> 078H11 GspE	(204)	---	---	---	---
<i>E. coli</i> K12 GspE	(195)	---	---	---	---
<i>Klebsiella</i> Pule	(201)	---	---	---	---
<i>Ps. aeruginosa</i> GspE	(295)	---	---	---	---
<i>Vibrio</i> GspE	(120)	---	---	---	---
Copenhageni GspE	(264)	---	---	---	---
Hardjobovis GspE	(264)	---	---	---	---
Lai GspE	(264)	---	---	---	---
Patoc GspE	(265)	---	---	---	---
Consensus	(301)	---	---	---	---

		101	150	151	200
<i>E. coli</i> 078H11 GspE	(28)	WCEAS-LEILHVEPLSLSVLQELQRLNAPFTLRQIDEAEFEQRINAVWQ	RDSEARQLMEDIQS-AEDFFTLAEELPETE	---	---
<i>E. coli</i> K12 GspE	(18)	GYLYSEGEIILYLDATPFERLIDLQRVGQCQMTSLSQADFEARLEAVFH	QNTGESQIQADIDQ-SVDLLSSEEMPAE	---	---
<i>Klebsiella</i> Pule	(24)	LSSGESCEVFCIAVTAPQALLEARVAAMPFRLEERLEEEAFELLVLSYQ	RDSAEARRMMADTGN-ELDLYTLAEELPDTD	---	---
<i>Ps. aeruginosa</i> GspE	(95)	DVAAVTPLMSYAFQRHGILAVALSPEEVTIASAQPFFVQGWENLVHLK	RPFKRVANPADIQRYTVEFFRLIARSVGATSPDQKISGVGNFEQLNLNG	---	---
<i>Vibrio</i> GspE	(1)	---	---	---	---
Copenhageni GspE	(87)	VPFSLSKKTIIRIIVSDPSSLHPMDARNFLKGVNVEFILAPEPEIMRIIH	SHFDNTSSAAKEMLNEMEGSFSLEAAEFN	---	---
Hardjobovis GspE	(87)	VPFQLSKKTIRVAVSDPSSLHPMDVRFNFKGVNVEFVLAPEPEIMRIIH	SQFDDTSSAAKEMLNEMEGSFSLEAAEFN	---	---
Lai GspE	(87)	VPFSLSKKTIIRIIVSDPSSLHPMDARNFLKGVNVEFILAPEPEIMRIIH	SHFDNTSSAAKEMLNEMEGSFSLEAAEFN	---	---
Patoc GspE	(88)	VPFVFKGKVFVATSDPSSLHPMDMRSFLKGYEIQFVLA TENEIMRIVH	SQFDDKTTAAKEMLNEMEGSFSGLDSDAFES	---	---
Consensus	(101)	VPFVFKGKVFVATSDPSSLHPMDMRSFLKGYEIQFVLA TENEIMRIVH	SQFDDKTTAAKEMLNEMEGSFSGLDSDAFES	---	---
<i>E. coli</i> 078H11 GspE	(107)	---	---	---	---
<i>E. coli</i> K12 GspE	(98)	---	---	---	---
<i>Klebsiella</i> Pule	(104)	---	---	---	---
<i>Ps. aeruginosa</i> GspE	(195)	---	---	---	---
<i>Vibrio</i> GspE	(23)	---	---	---	---
Copenhageni GspE	(167)	---	---	---	---
Hardjobovis GspE	(167)	---	---	---	---
Lai GspE	(167)	---	---	---	---
Patoc GspE	(168)	---	---	---	---
Consensus	(201)	---	---	---	---
<i>E. coli</i> 078H11 GspE	(204)	---	---	---	---
<i>E. coli</i> K12 GspE	(195)	---	---	---	---
<i>Klebsiella</i> Pule	(201)	---	---	---	---
<i>Ps. aeruginosa</i> GspE	(295)	---	---	---	---
<i>Vibrio</i> GspE	(120)	---	---	---	---
Copenhageni GspE	(264)	---	---	---	---
Hardjobovis GspE	(264)	---	---	---	---
Lai GspE	(264)	---	---	---	---
Patoc GspE	(265)	---	---	---	---
Consensus	(301)	---	---	---	---

		201	250	251	300
<i>E. coli</i> 078H11 GspE	(107)	---	---	---	---
<i>E. coli</i> K12 GspE	(98)	---	---	---	---
<i>Klebsiella</i> Pule	(104)	---	---	---	---
<i>Ps. aeruginosa</i> GspE	(195)	---	---	---	---
<i>Vibrio</i> GspE	(23)	---	---	---	---
Copenhageni GspE	(167)	---	---	---	---
Hardjobovis GspE	(167)	---	---	---	---
Lai GspE	(167)	---	---	---	---
Patoc GspE	(168)	---	---	---	---
Consensus	(201)	---	---	---	---
<i>E. coli</i> 078H11 GspE	(204)	---	---	---	---
<i>E. coli</i> K12 GspE	(195)	---	---	---	---
<i>Klebsiella</i> Pule	(201)	---	---	---	---
<i>Ps. aeruginosa</i> GspE	(295)	---	---	---	---
<i>Vibrio</i> GspE	(120)	---	---	---	---
Copenhageni GspE	(264)	---	---	---	---
Hardjobovis GspE	(264)	---	---	---	---
Lai GspE	(264)	---	---	---	---
Patoc GspE	(265)	---	---	---	---
Consensus	(301)	---	---	---	---

		301	350	351	400
<i>E. coli</i> 078H11 GspE	(204)	RVSTWPSAWGERVRLRLDKNQABLTLERILGSQLTAQLRQLLHKPHGI	FLVTGPTGSGKSTFLYAGLQELNNSHRNILEVDDPIETMIEGIGQTVNT	---	---
<i>E. coli</i> K12 GspE	(195)	RVSTLPSYGERAVRLRLDKNSLQLSNLNGMTAADKQDLENLQLPHGI	ILVTGPTGSGKSTFLYALISALNTPGRNILEVDDPVELEEGIGQTVNT	---	---
<i>Klebsiella</i> Pule	(201)	RVSTLPSYGERVRLRLDKNSVNLDTLGTMTFALLRQVQDGLIARPHGI	VLVTGPTGSGKSTFLYALSRIDARERNIMIEDPIEYELGIGQTVNA	---	---
<i>Ps. aeruginosa</i> GspE	(295)	RLSTLPTAFGEKVMRIFDPEVLKSFQDFGSADDLRRWQSMTSQPNGI	ILVTGPTGSGKSTFLYTKQLATDEVNCTIEDPIEMIEFSFNQMVQH	---	---
<i>Vibrio</i> GspE	(120)	RVSTMESHGERVRLRLDKNATRLDLSLGMTAHNHDNFRRLIKRPHGI	ILVTGPTGSGKSTFLYAGLQELNNSERNILEVDDPIEDIDIGIGQTVNP	---	---
Copenhageni GspE	(264)	RVSTIFCQFGERIYRMLLNKTDQKYSLDTMGFYELIQSLRSLEYEPHGI	ILVTGPTGSGKSTFLYSAISELNTEERNILEVDDPVEYQIEGISOMQOE	---	---
Hardjobovis GspE	(264)	RVSTIFCQFGERIYRMLLNKTDQKYSLDTMGFYDLIKSLRSLEYEPHGI	VLVTGPTGSGKSTFLYSAISELNTEERNILEVDDPVEYQIEGISOMQOE	---	---
Lai GspE	(264)	RVSTIFCQFGERIYRMLLNKTDQKYSLDTMGFYELIQSLRSLEYEPHGI	ILVTGPTGSGKSTFLYSAISELNTEERNILEVDDPVEYQIEGISOMQOE	---	---
Patoc GspE	(265)	RVSTIFCQFGERIYRMLLNKTDQKYSIDTMGFNPOILKEFKELIYKPYGI	ILVTGPTGSGKSTFLYSAISELNTEERNILEVDDPVEYQMDGISOMQMD	---	---
Consensus	(301)	RVSTIFCQFGERIYRMLLNKTDQKYSIDTMGFNPOILKEFKELIYKPYGI	ILVTGPTGSGKSTFLYSAISELNTEERNILEVDDPVEYQMDGISOMQMD	---	---

Figura 14. Alineación de aminoácidos de GspE de la serovariedad Patoc con sus homólogos en leptospiras y 5 Gram negativas.

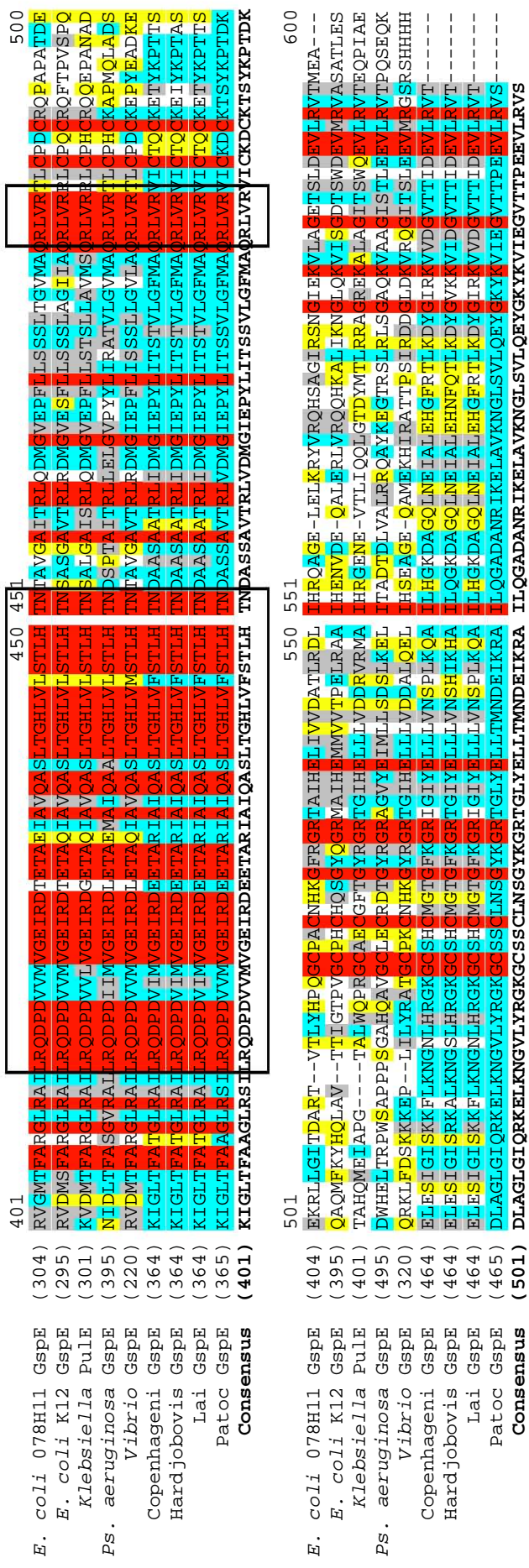


Figura 14. Alineación de las secuencias de aminoácidos de GspE de *L.biflexa* serovariedad Patoc, *L. interrogans* serovariedades Copenhageni y Lai; *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjobovis y 5 bacterias Gram negativas, por medio del programa Vector NT1. Los recuadros señalan las regiones con 3 o más aa conservadas. Regiones: Rojo = Idéntico (región conservada); Azul = conservados; Gris = bloques similares; Amarillo = débilmente similares.

Figura 15. Continúa. Alineación de aminoácidos de GspD de la serovariedad Patoc con sus homólogos en leptospiras patógenas.

			1	50	51	100
Copenhageneri	Gspd	(1)	-----MSGTISQLSIFRIFRISLILILFIVMDKPVFPQ			-----EPPSEKTFYANWRDTELNDFEKGMSAILKKNLILD
Hardjo	Gspd	(1)	-----MYGTISQFSIFRIFPILILILFIVMDKPVFPQ			SKKSSVTRSATAPAEKSFYANWRDTELNDFEKGMSAILKKNLILD
Lai	Gspd	(1)	MWKEVARFSPTNLLSETKMSGTISQLSIFRIFRISLILILFIVMDKPVFPQ			SKKTSVTRSATAPAEKSFYANWRDTELNDFEKGMSAILKKNLILD
Patoc	Gspd	(1)	-----MNLISFGIKMRNRLPSVVLVCLCYLIVTPNFSQEK			-----SFTADWRDTELNDFEKGMSAILKKNLILD
Consensus	(1)		MNLISFGIKMRNRLPSVVLVCLCYLIVTPNFSQEK			GKPKAKTSQEPA SFTADWRDTELNDFEKGMSAILKKNLILD
Copenhageneri	Gspd	(81)	ESLKGKKITLISQKEIPIKNGFIEMKSVLESLGFGVVEPDLISIVKIKD	150	151	200
Hardjo	Gspd	(82)	ESLKGKKITLISQKEIPIKNAFIEMKSVLESLGFGVVEPDLISIVKIKD			ALARSPVVRGKELIPEEVEGDRYRTITQVIPIENVKPELEPILKRLTSP
Lai	Gspd	(100)	ESLKGKKITLISQKEIPIKNGFIEMKSVLESLGFGVVEPDLISIVKIKD			ALARSPVVRGKELIPEEVEGDRYRTITQVIPIENVKPELEPILKRLTSP
Patoc	Gspd	(76)	DAVKGKKITLISQKRVREDAFGFMKSVLESLGFGVVEPDLISIVKIKD			ALAKSQVRIKQDPVSDSEVALNKTIITQIVPLVLEFSNAIELEPILKRVTFSP
Consensus	(101)		DAVKGKKITLISQKRVREDAFGFMKSVLESLGFGVVEPDLISIVKIKD			ALAKSQIVRIKQDPVSDSEVALNKTIITQIVPLVLEFSNAIELEPILKRVTFSP
Copenhageneri	Gspd	(181)	NTDVIYVRNTIIVLSGSADINKLLIVYSEFDVKIEEATPGSISSAGDI	250	251	300
Hardjo	Gspd	(182)	NTDVIYVRNTIIVLSGSCADINKLLIVINELDLKLEEASPGAIASAGDV			HIYTLFYSAEAKIAAIVLKLDPVVIQS-----EDI.GSERKPPPPCQP
Lai	Gspd	(200)	NTDVIYVRNTIIVLSGSADINKLLIVYSEFDVKIEEATPGSISSAGDI			HIYTLFHSAEAKIAAIVLKLDPVVIQS-----EET.SPEKKVPG--OI
Patoc	Gspd	(176)	DTDIIIPKQNTLIFSGSTADINKLLIVDNLVDRADG--PGSISSAGDI			HIYTLFYSAEAKIAAIVLKLDPVVIQS-----EDL.GSERKPPPPCQP
Consensus	(201)		DTDIIIPKQNTLIFSGSTADINKLLIVDNLVDRADG PGSISSAGDI			HIYTLFYSAEAKIAAIVLKLDPVVIQS-----EDL.GSERKPPPPCQP
Copenhageneri	Gspd	(273)	-----MP-KVDKIKAVGHKESNSVIVTAINAEWAERKIKIKVLD SARQK	350	351	400
Hardjo	Gspd	(272)	-----PMKVEKIKAVGHKESNSVIVTAINAEWAERKIKIKVLD SARQK			VLEVLIVELTSSDLNDFGIDWRKYGELFGQFN SGLSK.EANI INSNQVNV
Lai	Gspd	(292)	-----MP-KVDKIKAVGHKESNSVIVTAINAEWAERKIKIKVLD SARQK			VLEVLIVELTSSDLNDFGIDWRKYGELFGQFN SGLSK.EANI INSNQVIN
Patoc	Gspd	(274)	TAQAPKVGEGQDKIKAVAHKESNSLIVTATPQEWEEIKIKIKVLDTPRKQ			VLEVLIVELTSSDLNDFGIDWRKYGELFGQFN SGLSK.EANI INSNQVNV
Consensus	(301)		TAQAPKVGEGQDKIKAVAHKESNSLIVTATPQEWEEIKIKIKVLDTPRKQ			VLEVLIVELTSSDLNDFGIDWRKYGELFGQFN SGLSK.EANI INSNQVNV
Copenhageneri	Gspd	(366)	PNINTLSGFSILGFLKAGSEQLIGIILSANQGNENFNVL SAPQVLTVDNQEAE	450	451	500
Hardjo	Gspd	(365)	PNVNTLSGFSILGFLKAGSEQLIGIILSANQGNENFNVL SAPQVLTVDNQEAE			EISVGQDVPVRTQSRNAGTGGTNAVITVDNVEYRPTGIGIKLFTPHVKNKNNK
Lai	Gspd	(385)	PNINTLSGFSILGFLKAGSEQLIGIILSANQGNENFNVL SAPQVLTVDNQEAE			EISVGQDVPVRTQSRNAGTGGTNAVITVDNVEYRPTGIGIKLFTPHVKNKNNR
Patoc	Gspd	(373)	TNVNTLSGFSILGFLKAGSEQLIGIILSANSTNENFNVL SAPQVLTVDNQEAE			EISVGQDVPVRTQSRNAGTGGTNAVITVDNVEYRPTGIGIKLFTPHVKNKNNK
Consensus	(401)		TNVNTLSGFSILGFLKAGSEQLIGIILSANSTNENFNVL SAPQVLTVDNQEAE			EISVGQDVPVRTQSRNAGTGGTNAVITVDNVEYRPTGIGIKLFTPHVKNKNNR
Copenhageneri	Gspd	(466)	ITLELFOEIKNAIEIALAG--GNPTFNRRREIKTISIENITQSIVIGGLIS	550	551	600
Hardjo	Gspd	(465)	ITLELFOEIKNAIEIALAG--GNPTFNRRREIKTISIENITQSIVIGGLIS			NDKQKRITIKIPFLGDI EYLGHLFKRTEKIKKTNLMWVFI TPHILDSEETA
Lai	Gspd	(485)	ITLELFOEIKNAIEIALAG--GNPTFNRRREIKTISIENITQSIVIGGLIS			NDKQKRITIKIPFLGDI EYLGHLFKRTEKIKKTNLMWVFI TPHILDSEETA
Patoc	Gspd	(473)	ITLDIYQEIKNVAGISSEATGNGNPTFNKPEIKTIVVDIQTIVIGGLIS			NDKQKRITIKIPFLGDI EYLGHLFKRTEKIKKTNLMWVFI TPHILDSEETA
Consensus	(501)		ITLDIYQEIKNVAGISSEATGNGNPTFNKPEIKTIVVDIQTIVIGGLIS			NDKQKRITIKIPFLGDI EYLGHLFKRTEKIKKTNLMWVFI TPHILDSEETA
Copenhageneri	Gspd	(564)	DKMTVKKMVOEERVELERERILNKEREIRERGD---	636		
Hardjo	Gspd	(563)	DKMTVKKMVOEERVELERERILNKEREIRERGD---			
Lai	Gspd	(583)	DKMTVKKMVOEERVELERERILNKEREIRERGD---			
Patoc	Gspd	(573)	DRMTIQKNEQERMVDEREKIR-----			
Consensus	(601)		DRMTIQKNEQERMVDEREKIR-----			

Figura 15. Alineación de las secuencias de aminoácidos de GspD de *L. biflexa* serovariedad Patoc, *L. interrogans* serovariedades Copenhageneri y Lai y *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjoberis, por medio del programa Vector NTI. Regiones: Rojo = Idéntico (región conservada); Azul = conservados; Gris = bloques similares; Amarillo = débilmente similares.

Figura 16. Continua. Alineación de aminoácidos de GspE de la serovariedad Patoc con sus homólogos en leptospiras patógenas.

		1	50	51	100
Copenhageneri GspE	(1)	-MKTLDGIIIEGGIIEKDEEDSLKVKKNNLPLSHIIQKKGIA	AGEADIL		
Hardjobovis GspE	(1)	-LKTLDGIIIEGGIIEKDEEDSLKVKKNNLPLSHIIQKKGIA	AGEADIL		
Lai GspE	(1)	-MKTLDGIIIEGGIIEKDEEDSLKVKKNNLPLSHIIQKKGIA	AGEADIL		
Patoc GspE	(1)	MRKSLGQIILEDGILTIKDLIEDISKQEQKTNLPLTHIIQKKGIA	SETDIL		
Consensus	(1)	MRKSLGQIILEDGILTIKDLIEDISKQEQKTNLPLTHIIQKKGIA	SETDIL		
		101	150	151	200
Copenhageneri GspE	(100)	VSDPSDLHPMDDARNFLKGYNVEFI LAP EP EIMRI IHSHPDN	TSSAAKEM		
Hardjobovis GspE	(100)	VSDPSDLHPMDDARNFLKGYNVEFV LAP EP EIMRI IHSQFD	TSSAAKEM		
Lai GspE	(100)	VSDPSDLHPMDDARNFLKGYNVEFI LAP EP EIMRI IHSHPDN	TSSAAKEM		
Patoc GspE	(101)	TSDPTDLHPMDDMRSLFKGYEIQFLATENEIMRIVHSQPK	TAAKEM		
Consensus	(101)	TSDPTDLHPMDDMRSLFKGYEIQFLATENEIMRIVHSQPK	TAAKEM		
		201	250	251	300
Copenhageneri GspE	(200)	FYEKSLVRYRVDGIIHNVLSPPKSYHAGISSRIKIMSNL	NIENRLLPQD		
Hardjobovis GspE	(200)	FYEKSLVRYRVDGIIHNVLSPPKSYHAGISSRIKIMSNL	NIENRLLPQD		
Lai GspE	(200)	FYEKSLVRYRVDGIIHNVLSPPKSYHAGISSRIKIMSNL	NIENRLLPQD		
Patoc GspE	(201)	FYEKSLVRYRVDGVIQKVLNPPKSYLAGISTRIKIMSNL	NIENRLLPQD		
Consensus	(201)	FYEKSLVRYRVDGVIQKVLNPPKSYLAGISTRIKIMSNL	NIENRLLPQD		
		301	350	351	400
Copenhageneri GspE	(300)	IQLSLRIYEPHGIILVVTGPTGSGKSTTLYSALS	ELNTERBNIITCEDPV		
Hardjobovis GspE	(300)	IKSLRLIYEPHGIILVVTGPTGSGKSTTLYSALS	ELNTERBNIITCEDPV		
Lai GspE	(300)	IQLSLRIYEPHGIILVVTGPTGSGKSTTLYSALS	ELNTERBNIITCEDPV		
Patoc GspE	(301)	LKEFKELIYKPYGIIIVTGP	TGSGKSTTLYSALS	ELNTERBNIITCEDPV	
Consensus	(301)	LKEFKELIYKPYGIIIVTGP	TGSGKSTTLYSALS	ELNTERBNIITCEDPV	
		401	450	451	500
Copenhageneri GspE	(400)	QASLTGHLVPLSTLHTNDAASAATRLIDMGIEPYLIT	STVLGFM	AQRLVRY	
Hardjobovis GspE	(400)	QASLTGHLVPLSTLHTNDAASAATRLIDMGIEPYLIT	STVLGFM	AQRLVRY	
Lai GspE	(400)	QASLTGHLVPLSTLHTNDAASAATRLIDMGIEPYLIT	STVLGFM	AQRLVRY	
Patoc GspE	(401)	QASLTGHLVPLSTLHTNDAASAATRLIDMGIEPYLIT	SSVLGFM	AQRLVRY	
Consensus	(401)	QASLTGHLVPLSTLHTNDAASAATRLIDMGIEPYLIT	SSVLGFM	AQRLVRY	
		501	550	551	
Copenhageneri GspE	(500)	IYELLVNSPLKQAILHGKDAQOLNEIALEHGFRT	LKDYGIRK	KVVDGVTT	
Hardjobovis GspE	(500)	IYELLVNSHIAIKHAILQKDAQOLNEIALEHNFQ	LKDYGVK	VIDGVTT	
Lai GspE	(500)	IYELLVNSPLKQAILHGKDAQOLNEIALEHGFRT	LKDYGIRK	KVVDGVTT	
Patoc GspE	(501)	IYELLTMNDEIKRAILIQGADANRIKELAVKNGLS	VLQEQYK	KVIEGVTT	
Consensus	(501)	IYELLTMNDEIKRAILIQGADANRIKELAVKNGLS	VLQEQYK	KVIEGVTT	

Figura 16. Alineación de las secuencias de aminoácidos de GspE de *L. biflexa* serovariedad Patoc, *L. interrogans* serovariedades Copenhageneri y Lai y *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjobovis, por medio del programa Vector NTI. Regiones: Rojo = Idéntico (región conservada); Azul = conservados; Gris = bloques similares; Amarillo = débilmente similares.

El análisis de los dominios conservados, reveló que hay una región en la secuencia de 232 aa de GspD de la serovariedad Patoc de *L. biflexa*, que alinean en un 96.1% con la secuencia consenso que se identifica a las secretinas del sistema de secreción tipo II y III (Figura 17).

Figura 17. Secuencia de aminoácidos y dominio conservado de GspD de la serovariedad Patoc y 4 bacterias Gram negativas

>Patoc GspD

MNLSFGIKMRNRLPSVVLICLYLIVTPNFSQEKGKPKAKTSQEPASFTADWRDTELKDFLMGMSAI I KKNILIDDAVK
 GKKITIIISQKRVRIEDAFGFMKSVLETQGFGLIEENDLIKVVKIKDALAKSQIVRIGKDPVSDSEVALNKTITQIVPLE
 FSNAIELEPIILKRVTSPTDIIIPKNQNTLIFSGSTADINKLLKLVNDLVDVRADGPGS ISSAGDIHIYTTLEYNEAEKLA
 AILVKLMDPAPVAPTTQGAPGEAGADGKPAPPPQPTAQAPKVPKQDKIKAVAHKESNSLIVTATPQEWEEI KKI I KI
 LDTPRKQVLLLEVLIVEL**SSTDLNDFGIDWRYQELAYGQFNTGLAAQGGVIDKNGRPTNVNTLSGFSLGFIRRGQQIIG**
ILNANSTNENFNVL SAPQILTLDNQEA EINVGDVVPVRTQNRNAGLGGDNAVTVANFEYRPTGIKLLKFTPHINKNRIIT
LDLYQEIKNVAGISSEATGGNPTFNKRDIKTTIVVDNIQTIVIGGLSNDKQKVKIPILGEIPLLGLTFRRTTNQNR
KTNLMVFLTPHILDDRDKSDRMTIQKKNQERMVDEREKLLR

>E. coli K-12 GspD

MKGLNKITCCLLAALLMPCAGHAENEQYGANFNNADIRQFVEIVGQHLGKTI LIDPSVQGTISVRSNDTFSQOEYYOFFLSI LDLYGY
 SVITLDNGFLKVVRSANVKTSPGMIADSSRPVGVDELVTRIVPLENVPARDLAPLLRQMMDAGSVGNVVHYEPSNVLILTGRASTINK
 LIEVIKRVDIVGTEKQI IHLEYASAEDLAEILNQLISESHGKSQMPALLSAKIVADKRTNSLI ISGPEKARQRITSLKSLDVEESE
 EGNTRVYYLYKAKATNLVEVLTGVSEKLDKDEKGNARKPSSSGAMDVAITADEQTNLSLIVITADQSVQEKLATVIARLDIRRAQV**LVEA**
IIVEVQDGNLNLGVQWANKVGAQQFTNTGLPIFNAAQGVADYKKNNGGITSANPAWDMFSAYNGMAAGF FNGDWGVLTLALASNNKN
 DILATPSIVTLDNKLASEFVNGQDVPVLSGSQTTSGDNVFNVTVERKTVGTKLVTPQVNEGDVLLLEIQEVSSVDS SSSNSTLGPTFNT
 RTIQNAVLVKTGETTVVLGGLDDFSKEQVSKVPLLDGDIPLVGQLFRYTS TERAKRNL MVFIRPTIIRDDDVYRSLSKEKYTRYRQEQQ
 QRIDGKSKALVGSSEDLPVLDENTFN SHAPAPSSR

>K. pneumoniae PulD

MIIANVIRSFSLTLLIFAALLFRPAAAEFASFKGTDIQEFINTVSKNLNKTVI IDPSVRGTTVRSYDMLNEEQYYQFFLSVLDVY
 GFAVINMNGVLKVVRSKDAKTAAPVVASDAA PGIGDEVVTRVVPLTNVAARDLAPLLRQLDNAGVGSVVHYEPSNVLLMTGRAAVI
 KRLLTIVERVDNAGDRSVVTVPLSWASAADVVKLVTELNKDTSKSALPGSMVANVADERTNAVLVSGEPNSRQRI IAMIKQLDRQQA
 TQNGTKVIYLYKAKASDLVEVLTGISSTMQSEKQAAKVAALDKNII IKAHQTNALIVTAAPDVMMDLERVIAQLDIRRPQV**LVEAI**
IAEVQDADGLNLGIQWANKNAGMTQFTNSGLPISTAIAGANQYKNDGTVSSSLASALSSFNGIAAGFYQGNWAMLLTALSSSTKNDIL
ATPSIVTLDNMEATFNVGQEVVLTGSGTTSQDNI FNTVERKTVGIKLVKVPQINEGDSVLLBIEQEVSSVADAASSTSSDLGATFNT
RTVNNAVLVGSGETTVVVGGLLDRKSVSDTADKVPLLGDI PVIGALFRSTSKKVKRNLMLFIRPTVIRDRDEYRQASSGQYTAFNDAQS
 KQKGKENDAMLNQLLEIYPRQDTAAFRQVSAAI DAFNLGGNL

>E. coli Dysenteriae GspD

MGPVQGGKVSIRTMTPLNERQYYQLFLNLLLEAQGYAVVPMENDVLKVVKSSAAKVEPLPLVGEESDNYAGDEMVTKVVPVRELAPILR
 QMIDSAGSGNVVNDPSNIVMLTGRASVVERL TEVIQRVDHAGNRTEEVI PLDNASASEIARVLES LTKNSGENQPATLKSQIVADER
 TNSVIVSGDPATRNKMRRLIRRLDSEMERSGNSQVFLKYSKAEDLVDLKQVSGTLTAAKEEAEGTVGSGREVVS IAASKSNALIV
 TAPQDIMQSLQSVIEQLDIRRAQVH**VEALIVEVAEGSNINFGVQWASKDAGLMQFANGTQIPI GTLGAAISQAKPQKGSTVISENGAT**
TINPDTNGDLSTLAQLLGGFSGTAVGVVKGDMALVQAVKNDSSSNVLS TPSITTLDNQEAFFVMGQDVPVLTGTVGSSNNSNPFNTV
ERKKVGMILKVTVPQINEGNAVQMVIEQEVSKVEGQTSLDVVFGERKLLKTTVLANDELIVLGGLMDDQAGESVAKVPLLDGDIPLIGNL
FKSTADKKEKRNLMVFIRPTILRDGMAADGVSQRKYNMRAEQIYRDEQGLSLMPHTAQPVLP AQNQALPPEVRAFLNAGRTR

>V. cholerae EpsD

MKYWLKSSWLLAGSLLSTPLAMANEFSASFKGTDIQEFINIVGRNLEKTI IVDPSVRGKVDVRSFDTLNEEQYYSSFFLSVLEVYGFA
 AVEMDNGVLKVIKSKDAKTAIPVLSGEERANGDEVITQVAVKNNVSVRELSPLLQLIDNAGAGNVVHYDPANI I LITGRAAVNRL
 AEI IRRVDQAGDKEIEVVVELNNSAAEMVRIVEALNKTTDAQNTPEFLKPKFVADERTNSILISGDPKVRERLKRLIKQLDVEMAAKG
 NNRVVYLYKAKAEDLVEVLKGVSENQAEGTGQPTTSKRNEVMI AAHADTNSLVLTAPQDIMNAMLEVIQGLDIRRAQV**LIEALIVE**
MAEGDGINLVGQWLSGSGSVIQYGTGASIGNVMI GLEBAKDTTQTKAVYDTNNNFLRNETTTTKGDYTKLASALSSIQGAAVSIAM
GDWTALINAVSNDSSSNILSSPISITVMNDEASFI VEGEVPVITGSTAGSNNDNPFQTVDRKEVGIKLVVPPQINEGNSVQLNIEQEV
SNVLGANGAVDVRFAKRLNTSVMVQDQMLVGLGLIDERALESKVPPLLDGDIPLLGQLFRSTSSQVEKKNLMVFIKPTIIRDGVTA
 DGITQRKYNVIRAEQLFRAEKGLRLLDDASVPVLPKFGDDRRHSPEIQAFIEQMEAKQ

Las letras en azul muestran el dominio conservado de las secuencias, datos obtenidos por el programa CDD del NCBI. Región que identifica a GspD de Patoc con otras secretinas del SST-II.

El análisis de los dominios conservados en GspE de Patoc, reveló que hay una región en la secuencia de 264 aa que alinea en un 100% con la secuencia consenso, que identifica a las ATPasas del sistema de secreción tipo II, como PulE de *Ps. aeruginosa* (Figura 18).

Figura 18. Secuencia de aminoácidos y dominio conservado de GspE de la serovariedad Patoc y 4 bacterias Gram negativas

>Patoc GspE

MRKSLGQIILEDGILTIKDLEDISKQQEKTNLPLTHIIQKKGLASETDILKALAKLHRMEFYDKLEFVASDEIFSKIPL
 KLVQRSKIVPFLVKGKQVVFVATSDPTDLHPMDDMRSFLKGYEIQFVLATENEIMRIVHSQFDKTTAEAKEMMDEMDSF
 GDLSDAFESDALDL.SNEAPIIKMVNVILSQAVSERASDIHIEPFKSVIVRYRVDGVI.QKVLNPPKSYLAGIST**RIKIM**
SNLNIAENRLPQDGRIKLRLAGKDVRVRSIIPCQFGERIVMRI LNKT DQKYSIDTMGFNPQILKEFKELIYKPYGIIL
VTGPTGSGKSTTLYSALSEINTEERNIITCEDPVEYQMDGISQMOMNDKIGLTFAGLRSILRQDPDVMVGEIRDDEET
ARIAIQASLTGHLVSTLHTNDASSAVTRLVDMGIEPYLITSSVLGFMAQRLVVRVICKDCKTSYKPTDKDLAGLGIQRK
ELKNGVLYRGKGCSSCLNSGYKGRTGLYEELTMNDEIKRAIILQGADANRIKELAVKNGLSVLQEYGYKVIIEGVTTPPEE
 VLRVS

>E. coli K-12 GspE

MRIHSPYPASWALAQIRIGYLYSEGEI IYLADTPFERLLDIQRQVGCQTMTSLSQADFEARLEAVFHQNTGESQQIAQD
 IDQSVDLLSLSEMPANEDLLNEDSAAPVIRLINAILSEAIKETASDIHIETYEKMSIRFRIDGVLRTILQPNKKLAA
 LLIS**RIKVMARLDIAEKRIPODGRISLRIGRRNIDVRVSTLPSIYGERAVLRLLDKNSLQSLNNGMTAADKQDLENL**
IQLPHGIIILVTGPTGSGKSTTLYAALSALNTPGRNILTVEDPVEYELEGIGQTQVNRVDMSFARGLRAILRQDPDVM
VGEIRDTEAQAIAVQASLTGHLVSTLHTNSASGAVTRLRDMGVESFLLSSSLAGIIAQRVLRRLCPQCRQFTPVSPQQ
AQMFKYHQLAVTTIGTPVGCPCPHCHQSGYQGRMAIHEMMVVTPELRAAIHENVDEQALERLVRQOHKALIKNGLQKVISG
 DTSWDEVMRVASATLESEA

>K. pneumoniae PulE

MTPAAERRPLLPFGYARAHSVMLLSSGESCEVFCLAVTAPQALLEARRVAAMPFRLERLEEEAFEKLLVLSYQRDSAEA
 RRMADIGNELDLYTLAEELPDTDLLDSEDDAPIIRLINAMLTEAIEKASDIHIETYERHLQIRFRVDGVLREILRP
 QRRLAALLIS**RIKVMARLDIAEKRIPODGRMALRIGGRAVDVRVSTLPSYGERVLRLLDKNSVNLDDLTLGMPALL**
RQVDGLIARPHGIVLVTGPTGSGKSTTLYAALSRLDARERNIMTIEDPIEYELEGIGQTQVNAKVDMTFARGLRAILRQ
DPDVVLVGEIRDTEAQAIAVQASLTGHLVSTLHTNSALGAI SRLQDMGVPEPFLSTSLAVMSQRLVRRRLCPHCRQOE
PANADTAHQMEIAPGTALWQPRGCAECGFTGYRGRTGIEHELLVDDRVRMAIHRGENEVTLIQQLGTDYMTLRRAGREK
 ALAGITSWQEVLRVTEQPIAEAC

>E. coli Dysenteriae GspE

MVPVAQETTANTVRLPYSFSRRFSLVAWCEASLEILHVHPLSLSVLQELQRLNAPFTLRQIDEAEFEQRLNNTVWQRDS
 SEARQLMEELGSAEDFFTLAEELPETEDLLESDDDAPIIKLINAMLAEBAIKEGASDIHIETFEKSLVIRFRVDGTLHEM
 LRPGRKLASLLVS**RIKVMARLDIAEKRVPODGRIALLLGGRAIDVRVSTMP SAWGERVLRLLDKNQASLAQERLGLSQ**
QLTAQLRQLLHKPHGIFLVTGPTGSGKSTTLYAGLQELNNHSRNILTVEDPIEYMIIEGIGQTQVNRVGMTFARGLRAI
LRQDPDVMVGEIRDTEAQAIAVQASLTGHLVSTLHTNTAVGTITRLQDMGVPEPFLSSSLTGVMARLVRTLCPDCR
QAAPATDEETRLGITDARTVTLYHPQCPACNHKGFRGRTAIHELIVVDATLRDLIHRQAGEMELERYVRQHSAGIRS
 NGIEKVLAGETSLDEVLRVTMEA

>V. cholerae EpsE

MEDIGADSDDFSLAEELPQNEDELLESEDDAPIIKLINAMLGEAIEKASDIHIETFEKTL SIRFRVDGVLREVLAPSR
 KLSSLLVSRVKV**MAKLDIAEKRVPODGRISLRIGGRAVDVRVSTMPSSHGERVVMRLLDKNATRLDLHSLGMTAHNHDN**
FRRLIKRPHGIIILVTGPTGSGKSTTLYAGLQELNSSERNILTVEDPIEFDIDGIGQTQVNRVDMTFARGLRAILRQDP
DVVMVGEIRDLETAQAIAVQASLTGHLVSTLHTNTAVGAVTRLRDMGIEPFLISSLLGVLQAQRVRTLCPDCKEPYEA
DKEQRKLFDSKKKEPLILYRATGCPKCNHKGFRGRTGIEHELLVDDALQELIHSEAGEQAMEKHIRATTPSIRDDGLDK
 VRQGITSLEEVMRGSRSHHHHHH

Las letras en azul muestran el dominio conservado de la secuencia, datos obtenidos mediante el programa CDD del NCBI. Región que identifica con PulE (ATPasa) del SST-II

7.4 Predicción de la estructura secundaria de GspD y GspE

Las secuencias de aminoácidos de GspD y GspE fueron alineadas por medio del programa Vector NT1 y se intercaló la predicción de la estructura secundaria y predicciones obtenidas mediante el programa de cómputo NNPRELECT.

Los resultados se distinguen que en la proteína GspD de la serovariedad Patoc, se encuentran 11 hélices α y 14 hojas β , en la proteína GspE hay 16 hélices α y 13 hojas β .

Los resultados en las secuencias de GspD revelaron que hay ciertas diferencias entre las alineaciones, dentro de las cuales se apreció que hay mayor parecido en la posición de las estructuras hélices α y hojas β de *E. coli* (*E. coli* 078:H11 y *E. coli* K-12), igualmente sucede con las posiciones de las hélices α y hojas β entre *Klebsiella*, *Ps. aeruginosa* y *V. cholerae* (Figura 19).

La predicción de la estructura secundaria entre leptospiaras, es similar entre las serovariedades patógenas Copenhageni, Hardjobovis y Lai, pero difiere ligeramente la posición de las estructuras hélices α y hojas β en la serovariedad Patoc (Figura 19).

En la predicción de la estructura secundaria de la proteína GspE, la posición de las estructuras hélices α y hojas β , fue similar entre leptospiaras y bacterias Gram negativas. Sin embargo, se aprecia que la secuencia de hélices α y hojas β , parecen ser de mayor tamaño en la posición del aa 100 al 350 (Figura 20). Las estructuras hélices α y hojas β , en la serovariedad Patoc con sus homólogos en Copenhageni, Hardjobovis y Lai, fueron muy semejantes. Entre las serovariedades patógenas, la secuencia de las estructuras es casi idéntica (Figura 20).

Figura 19. Continúa. Alineación de aminoácidos y predicción de la estructura secundaria de la proteína GspD en leptospiros y 5 Gram negativas.

	1	50	100
<i>E. coli</i> 078H11 GspD	(1)	-----	-----MGPVGQCKVSIRITWTPLNERQY
<i>E. coli</i> k12 GspD	(1)	-----	-----HH
<i>Klebsiella</i> Puld	(1)	-----	-----EEEE
<i>Ps. aeruginosa</i> GspD	(1)	-----	-----HH
<i>Vibrio</i> Epsd	(1)	-----	-----EEEE
<i>Copenhageni</i> GspD	(1)	-----	-----HH
<i>Hardjo</i> GspD	(1)	-----	-----EEEE
<i>Lai</i> GspD	(1)	-----	-----EEEE
<i>Patoc</i> GspD	(1)	-----	-----EEEE
<i>E. coli</i> 078H11 GspD	(23)	150	200
<i>E. coli</i> k12 GspD	(76)	-----	-----EEEE
<i>Klebsiella</i> Puld	(78)	-----	-----EEEE
<i>Ps. aeruginosa</i> GspD	(101)	-----	-----EEEE
<i>Vibrio</i> Epsd	(75)	-----	-----EEEE
<i>Copenhageni</i> GspD	(48)	-----	-----EEEE
<i>Hardjo</i> GspD	(49)	-----	-----EEEE
<i>Lai</i> GspD	(67)	-----	-----EEEE
<i>Patoc</i> GspD	(47)	-----	-----EEEE

Figura 19. Alineación de aminoácidos y predicción de la estructura secundaria de la proteína GspD en leptospiras y 5 bacterias Gram negativas

	201	250	251	300
<i>E. coli</i> 078H11 GspD (120)	SVVERLITEVIQRVDHAGNRTE-EVYPLDNASASAEIARVLESILTKNM--GE	NQPATLKSQIVADERTNSVIVSGDPATRDKMRLIRRLDSEMER----		
	-EEHHHHHHHHHHH----	EE-----EE-----EE-----HHHHHHHHH-HH-		
<i>E. coli</i> k12 GspD (172)	STINKLIEVIKRVVDVIGTEKQ-QIIHLEYASAEIDAEIILNQLISESHGKS	QMPALLSAKIVADKRTNSLIISGPEKARQRIITSLKSLDVEESE----		
	-----HHHHHH--EE-----HH-HEEEHHH-----HHHHHHHHH-	-----EEE-----EEE-----HHHHHHH-		
<i>Klebsiella</i> Puld (174)	AVIKRLLTIVERVDNAGDRSV-VTVPLSWASAAVVKLVTELNKDTN--KS	ALPGSMVANVADERTNAVLSGEPNSRQRIIAMIKQLDRQQAT----		
	HHHHHHHHHHHHH----	EE-----EE-----EE-----HEHEHHHHH--HH-		
<i>Ps. aeruginosa</i> GspD (189)	ANIARIEDVIRQLDQKGSVDY-SVINLRGWVMDAAEVIINNAMSRG--Q	-AKGAAGAQVIADARTNRLIILGPPQARAKLVLAQSLDITPTAR----		
	-----HHHHHHH--E-----E--E-----HHHHHHHHHHH--H	-----HEEE-----EEE-----HHHHHHHHH-		
<i>Vibrio</i> Epsd (171)	AVNRLAEIIRRVDAQDKEI-EVVELNNA SAAEMVRIVEALNKTTD-AQ	NTPEFLKPKFVADERTNSILISGDPKVRERLRLIKQLDVEMAA----		
	HHHHHHHHHHHHH----	EE-----EE-----EE-----HHHHHHHHHHHHHHH-		
<i>Copenhageni</i> GspD (136)	PIVRVGKELIPEEEVGDYRTITQVIPENVKPELEPIIKRLTSPN--	-----EEE-----EEE-----HHHHHHHHHHH-		
	--EH-----E-EEE-----E-----HHHHH-	-----EEE-----EEE-----HHHHHHHHHHH-		
<i>Hardjo</i> GspD (137)	PVVRVGKELIPETEVGDYRTITQIPIENTKPELEPIIKRLTSPN--	-----EEE-----EEE-----HHHHHHHHHHHHH-		
	--H-----EH-----E-----E-----HHHHH-	-----EEE-----EEE-----HHHHHHHHHHHHHHH-		
<i>Lai</i> GspD (155)	PIVRVGKELIPEEEVGDYRTITQVIPENVKPELEPIIKRLTSPN--	-----E-EEE-----E-----HHHHH-		
	--EH-----E-EEE-----E-----HHHHH-	-----EEE-----EEE-----HHHHHHHHHHHHH-		
<i>Patoc</i> GspD (131)	QIVRIKDPVSDSEVALNKTTITQIVPLFNSNAIELEPIIKRVTSPD--	-----TDIIIPKNQNTLIFSGSTADINKLLKLVNDLVDVADG--PGSI		
	HHHHH-----HHHHH-----EEE-----HHHHHHHHH-	-----EE-----EE-----HHHHHHHHHHH-		
<i>E. coli</i> 078H11 GspD (211)	--SGNSQVYLYKSKAEDLVDVLKQVSGTLTAAK-----EEAEG	TVGSG-----REIVSIAASKHSNALIVTAPQDIMQSLQSVIEQL		400
	-----EEEE-----HHHHHHH-----H	-----EEEEHHH-H-----EEE-----HHHHHHHHH-H		
<i>E. coli</i> k12 GspD (265)	--EGNTRVYLYKAKATNLVEVLTVGVSEKLDKDKG-----NARKP	SSSGA-----MDNVAITADEQTNLSLVTADQSVQEKLATVIARL		
	-----EEEEHH-----HHHEHHHHHHH-----H	-----EE-----EE-----EEEE-----HHHHHHHHHHHH		
<i>Klebsiella</i> Puld (266)	--QGNTKVIYLYKAKASDLVEVLTVGISTMQSEK-----QAAKP	-VAAL-----DKNIIKAHQTNALIVTAAAPDVMDLERVIAQL		
	-----EEEEHHH-----HHEEE-----HHH-H	-----HHEE-----HEEE-----HHHHHHHHH-		
<i>Ps. aeruginosa</i> GspD (278)	--SANTRVIRLRHNDAKTLAETLQIISEGMKNNG-----GQGEQ	TGGR-----PSNIIIRADESTNALVLLADPDTVNALEDIVRQL		
	-----HHEEE-----HHHHH-HH-	-----EEEE-----HHHEE-----HHHHH-		
<i>Vibrio</i> Epsd (263)	--KGNRVVYLYKAKAEDLVEVLKGVSENLAQEK-----GTGQP	TTSK-----RNEVMTAAHADTNSLVTAPQDIMNAMLEVIQQL		
	-H-----HHEHHH-----HHHHHHH-----HHHHH	-----HHHHH-----EE-----HHHHHHHHH-H-		
<i>Copenhageni</i> GspD (225)	SSAGDIHIYTYLSEAEKIAATLVKLDNPIQSE-----DLGSEKRP	PPPGQ-----PMPKVDKIKAVGHKESNSVIVTATNAEWAERKIIKVL		
	-----EEEE-H-HHHHHHHHHH-----	-----HHH-----EEEE-----HHHHHHHHHH		
<i>Hardjo</i> GspD (226)	ASAGDVHIYTYLSEAEKIAATLVKLDNVPVQSE-----ELSPEKK	-VPGQ-----IPMKVEKIKAVGHKESNSVIVTATNAEWAERKIIKVL		
	E-----E-----H-HHHHHHHHHH-----	-----HHHHHHH-----EEEE-----HHHHHHHHHHHH		
<i>Lai</i> GspD (244)	SSAGDIHIYTYLSEAEKIAATLVKLDNPIQSE-----DLGSEKRP	PPPGQ-----PMPKVDKIKAVGHKESNSVIVTATNAEWAERKIIKVL		
	-----EEEE-H-HHHHHHHHHH-----	-----HHHH-----EEEE-----HHHHHHHHHHHH		
<i>Patoc</i> GspD (218)	SSAGDIHIYTYLSEAEKLAAILVKLDMPDAPVAPTTQGAPEFAGDGKP	APPPQTAQAPKVPKQDKIKAVAHKESNSLIVTATPQEWEEIKKIIKIL		
	EEEE-----HHHHHHHHHHHHH-----	-----HHHHH-----EEEE-----HHHHHHHHHHH-		

Figura 19. Alineación de aminoácidos y predicción de la estructura secundaria de la proteína GspD en leptospiras y 5 bacterias Gram negativas

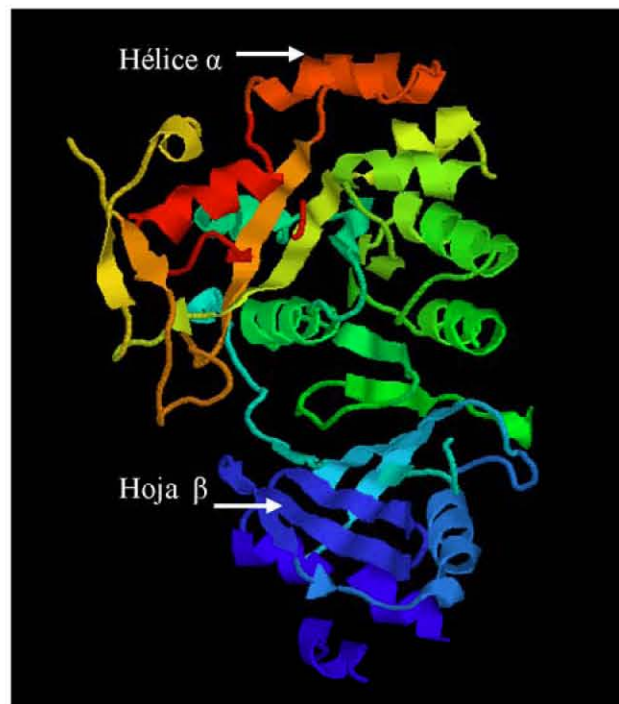
	601	650	651	700
<i>E. coli</i> 078H11 GspD (481)	T---	SLDVVFGRRKLTVVLANDGELIVLGLMDDQAGESVAKVPLLG	DIPILGNLFKSTADKKEKRNLMVFI	RPTILIRDRGMAADGVSQRKYNMRAE
	-----	EEEE--H--EEEE--HHEEE--HH--	---HE--H--HHHHHHHEE--	-----H--
<i>E. coli</i> k12 GspD (518)	SN---	STLGPFTFTRTIQNAVLKGTGETVVLGGLLDDF	SKEQVSKVPLLG	DIPLVGQLFRYFSTERAKRNLMVFI
	-----	HHHHEE--HEEE--H--	HHHHHHHEE--	IRDDDVYRSLSKEKYTRYRQE
<i>Klebsiella</i> Puld (515)	ASSTSDLGATFNTRTVNNAVLVGSGETVVVGGLLDKSVSDTADKVPLLG	-----	EEEEHH--H--HHHHHEE--	-----H--
	-----	EE--HEEE--EEEE--	HHHHHEE--	DIPVIGALFRSTSKVSKRNLMVFI
<i>Ps. aeruginosa</i> GspD (526)	AQQR--	NNTDLITSKRSIKSTILAENGQVIVIGGLIQDDVSQAESKVPLLG	DIPLLGRILFRSTKDTHTKRNLMVFI	RPTVVRDSAGLAALSGKYSDIRVI
	-----	EH--EEEE--EEEE--E--	HH--HHH--HHHEE--	H--HHH--EEEE
<i>Vibrio</i> EpsD (535)	NG---	AVDVFARQLNTSMVQDQMLVLGGLIDERALESESKVPLLG	DIPLLGQLFRSTSSQVEKKNLMVFI	IKPTIIRDGVTADGITQRKYNIRAE
	-----	HHHHHHH--EEEH--HEEE--HHHH--	HH--HHHEE--EE--	HHH
<i>Copenhageni</i> GspD (481)	ALAG--	GNPTFNRRREIKTSISIENTQSIVIGGLISNDKQKRIKIPFLG	DIPYLGHLFKRTEKIKKTNLMVFI	ITPHILDSRETADKMTVKKKMQQERY
	HH--	-----	EEEE--EEEE--	HH--HHH--HHH
<i>Hardjo</i> GspD (480)	ALAG--	GNPTFNRRREIKTSISIENTQSIVIGGLISNDKQKRIKIPFLG	DIPYLGHLFKRTEKIKKTNLMVFI	ITPHILDSRENADKMTVKKKMLQEQY
	HH--	EEEE--EEEE--	HH--HHHHHHH--	EEEE--HHH--HHHHH
<i>Lai</i> GspD (500)	ALAG--	GNPTFNRRREIKTSISIENTQSIVIGGLISNDKQKRIKIPFLG	DIPYLGHLFKRTEKIKKTNLMVFI	ITPHILDSRETADKMTVKKKMQQERY
	HH--	EEEE--EEEE--	HH--HHHHHHH--	EEEE--HHH--HHH
<i>Patoc</i> GspD (488)	SSEAT--	GGNPTFNKRDIKTTIVDNIQTIVIGGLISNDKQKQKIPILG	EIPLLGTLFRRTTNQRKTNLMVFI	ITPHILDDRDKSDRMTIQKKNEQERM
	EE--	EEEE--EEEE--	HH--HH--	EEEE--HE--H
<i>E. coli</i> 078H11 GspD (576)	QIVRDEQGLS--	LMPHTAQVLP--	AQNQALPPEVRAFFNAGRTR--	-----
	---HH--	-----	HHHHHHH--	-----
<i>E. coli</i> k12 GspD (615)	Q--QOR	IDGSKALVGSDELPLVDENTFN	SHAPAPSSR--	-----
	-----	EE--	-----	-----
<i>Klebsiella</i> Puld (615)	QSKQR	KENNDAMLNQLLEIYPRQDTAAFRQVSA	AIDAFNLGGNL	-----
	-----	HHHH--HE--	HHHHHHHHHHH--	-----
<i>Ps. aeruginosa</i> GspD (625)	DGTRGPEGRP--	SILPTNANQLFDGQAVDLRELMT	-----	-----
	-----	HHHHHH--	-----	-----
<i>Vibrio</i> EpsD (631)	QLFRAEKGLR--	LLDDASVPLPKFGDRRHSPEIQAFIEQMEAKQ	-----	-----
	HHHHHHHHH--	HH--	HHHHHHH--	-----
<i>Copenhageni</i> GspD (578)	ELERERILNKEREIR--	ERGD--	-----	-----
	-----	HHHHH--HHHH--	-----	-----
<i>Hardjo</i> GspD (577)	ELERERILNKEKEIKSFFEKD	-----	-----	-----
	HHHHHHH--	HHHHHHH--	-----	-----
<i>Lai</i> GspD (597)	ELERERILNKEREIR--	ERGD--	-----	-----
	-----	HHHHH--HHHH--	-----	-----
<i>Patoc</i> GspD (587)	VDEREKKLR	-----	-----	-----
	HHHHH--	-----	-----	-----

Figura 19. Alineación de la secuencias de aminoácidos y predicción de la estructura secundaria de GspD de *L. biflexa* serovariedad Patoc, *L. interrogans* serovariedad Copenhageni y Lai; *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjovis y 5 bacterias Gram negativas, por medio del programa Vector NTI y NNREDICT. Las regiones enmarcadas indican las secuencias de aminoácidos PTTQAGP y PTAQAPK codificadas por *gspD* de Patoc, no presentes en *Leptospiras* patógenas ni en *E. coli*, *Klebsiella*, *Ps aeruginosa* y *V. cholerae*.
H = Hélices α
E = Hojas β

7.5 Predicción de la estructura terciaria de GspD y GspE

Los resultados de la predicción de la estructura terciaria de las secuencias de aminoácidos se realizaron mediante el programa de cómputo 3D-PSSM versión 2.6.0. La secuencia de aa de GspD de la serovariedad Patoc fue ingresada, pero no fue reconocida como proteína del SST-II o de algún otro sistema de secreción conocido. En contraste, al ingresar la secuencia de GspE fue reconocida por el programa con base en una cristalografía realizada previamente de una ATPasa (EpsE) de *V. cholerae* (Robien *et al.*, 2003). El programa diseñó el siguiente modelo para GspE con 95% de certeza en la similitud (Figura 21).

Figura 21. Modelo de la predicción de la estructura terciaria de GspE de la serovariedad Patoc.



Modelo obtenido por el programa 3D-PSSM, a partir del modelo de EpsE de *Vibrio cholerae*, generado por Robien *et al.*, (2003). El modelo indica la estructura tridimensional con base en las hélices α y hojas β .

8 DISCUSIÓN

El principal objetivo del presente proyecto fue la identificación de genes que codifican para supuestas proteínas del SST-II en la serovariedad apatógena Patoc de *Leptospira biflexa*, con la finalidad de colaborar al entendimiento de la organización del SST-II en *Leptospira*. En los genomas disponibles de las serovariedades Copenhageni y Lai han sido identificados los genes que codifican para supuestas proteínas del SST-II (Ren *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 2004). Sin embargo, son pocos los estudios que se han realizado para la caracterización de estas proteínas (de la Peña-Moctezuma *et al.*, 2002; Rodríguez-Reyes *et al.*, 2005). En otras especies bacterianas, proteínas de este sistema se han identificado participando en procesos de patogénesis como factores determinantes para la expresión de factores de virulencia, por ejemplo, la toxina termo-lábil de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) (Sandkvist, 2001; Tauschek *et al.*, 2002).

En este estudio, la serovariedad Patoc se desarrolló en medio EMJH alcanzando una turbidez de 0.5 de Mc Farland a los 5 días en promedio, más acelerado en comparación con los cultivos de leptospiros patógenas las cuales alcanzan una turbidez semejante en aproximadamente en 7 a 10 días. El método de extracción de ADN para bacterias Gram negativas (Ausubel *et al.*, 1993) adaptado para leptospiros, resultó satisfactorio alcanzando concentraciones de ADN de hasta 250 ng/μl.

Los resultados obtenidos por ensayos de PCR utilizando iniciadores degenerados, indicaron que *L. biflexa* serovariedad Patoc posee genes homólogos a *gspD* y *gspE*, los cuales son similares a otros que codifican para proteínas del SST-II de *L. borpetersenii* serovariedad Hardjo y *L. interrogans* serovariedades Lai y Copenhageni, además de otras bacterias que poseen este tipo de sistema de secreción. Estos genes parecen estar completos y son de tamaño muy similar a sus homólogos en leptospiros patógenas.

La amplificación de fragmentos de ADN por medio de los iniciadores degenerados BAP2357 y BAP2358 (Cuadro 5), resultó una metodología exitosa para éste fin y fue la pauta para obtener la primera secuencia de ADN, de la cual se derivaron 20 fragmentos más mediante PCR,

I-PCR y SSP-PCR para completar la secuencia de los genes *gspD* y *gspE*, principal objetivo de este estudio.

En cuanto a la aplicación de técnicas para secuenciar regiones aledañas desconocidas (“*chromosome walking*”) la técnica de I-PCR, resultó ser de más fácil diseño y aplicabilidad a diferencia de la SSP-PCR. Ambas estrategias resultaron ser efectivas para la amplificación de regiones aledañas desconocidas. Sin embargo, una desventaja en la metodología para realizar un SSP-PCR fue la limitación en las endonucleasas de utilidad, por ejemplo, el sitio múltiple de clonación (SMC) en pBlueScript posee 21 sitios de corte para diferentes enzimas, de las cuales sólo 15 tienen un corte cohesivo y no raso, ya que las enzimas de corte cohesivo producen cortes y uniones más específicas, traduciéndose en procesos de digestión-ligazón más eficientes.

La segunda limitante que se presenta comúnmente, es la distancia a la que está el sitio de corte, ya que debe estar a una distancia razonable (± 100 a 200 pb). Por último, también fue importante considerar el promedio del número de bases que se pueden secuenciar por fragmento, en nuestro caso, una buena secuencia contenía alrededor de 700 pb, aproximadamente.

La longitud de las secuencias de *gspD* (1,788 pb) y *gspE* (1,677 pb) en la serovariedad Patoc, fueron similares a sus homólogos en Copenhageni (*gspD* 1,791 pb; *gspE* 1,674 pb), Hardjobovis (*gspD* 1,794 pb; *gspE* 1,671 pb) y Lai (*gspD* 1,848 pb; *gspE* 1,671 pb). Se pensaría que entre Copenhageni y Lai habría mayor similitud en longitud ya que pertenecen a la misma especie *L. interrogans*, lo cual fue confirmado tanto por comparación de secuencias como por generación de dendogramas (Figuras 9, 11 y 12).

Al buscar identidades de *gspD* de Patoc entre secuencias de leptospiras patógenas por medio del programa BLASTn, sólo se alinearon en tres regiones con sus homólogos, dichas alineaciones sólo fueron de fragmentos con secuencia no mayor a 62 pb (denominados A 55/62 pb 88.0%; B 38/41 pb 92.0%; y C 62/75 pb 82.0%), lo que reveló que a nivel nucleotídico hay diferencias suficientes para no generar una alineación de toda la secuencia (Cuadro 7). En esta alineación, no se incluyeron los datos de la serovariedad Hardjobovis debido a que no están aún

disponibles en el banco de datos de la NCBI. En contraste, al utilizar el mismo programa en su modalidad de alineación de dos secuencias, las alineaciones el programa arrojaron como resultado 4 fragmentos de alineación (Cuadro 9), un fragmento más que al realizar un BLASTn con el banco de datos y además, se modificaron los porcentajes de identidad. Los resultados por este último sistema fueron muy similares entre Copenhageni y Lai (A 166/221 pb 75.0%; B 39/184 pb 75.0%; C 55/62 pb 88.0% y D 189/259 pb 72.0%); a diferencia de la secuencia de Hardjobovis en donde sólo se alinea en dos fragmentos (A 73/95 pb 76.0% y B 128/177 pb 72%). Al realizar el mismo procedimiento de alineaciones pero por el sistema de ClustalW, se apreció una identidad general con sus homólogos en leptospiras patógenas de 59.0%.

Las identidades de *gspE* de Patoc, entre secuencias de leptospiras patógenas por medio del programa BLASTn mostraron el mismo porcentaje de identidad (82.0%) entre la serovariedad Patoc y Copenhageni y Lai. Al realizar las alineaciones individuales por medio de BLASTn entre Patoc y sus homólogos en leptospiras patógenas, se observó que en todas las alineaciones se alinean dos fragmentos A y B (Cuadro 9), con 76.0% y 74.0% de identidad en Copenhageni y Lai respectivamente, a diferencia de Hardjobovis donde alinea con un porcentaje ligeramente menor (73.0%) para ambos fragmentos.

Al realizar la alineación por medio de ClustalW se observó una identidad general de 66.0% entre la serovariedad Patoc y sus homólogos en leptospiras patógenas. Con estos resultados, podríamos decir que las secuencias de *gspD* en leptospiras presentan una menor identidad en comparación con la secuencia de *gspE*, mostrando que este último gen está más conservado entre leptospiras, que el gen *gspD*. El gen *gspD* posee diferentes regiones conservadas a lo largo de su secuencia, pero no es posible afirmar que está altamente conservado basándonos en los porcentajes de identidad. Además, en la secuencia de *gspD* de Patoc hay una región entre las bases 739 a la 851 donde se aprecian 3 pequeños fragmentos (17, 5 y 9 pb) que no poseen las leptospiras patógenas ni otras bacterias Gram negativas, dichos fragmentos no influyen en la predicción de la estructura secundaria de GspD de la serovariedad Patoc (Figura 19). A diferencia, en las

secuencias de *gspE* se apreció mayor identidad entre las distintas serovariedades y sin huecos, lo que confirma el mayor grado de conservación a nivel nucleotídico de *gspE*.

A nivel de proteína, se buscaron identidades en el banco de datos de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Las alineaciones que resultaron fueron con una gran variedad de proteínas homólogas de distintas bacterias. En el Cuadro 8 sólo se enlistan las 10 primeras alineaciones con las que hubo mayor identidad. Sin embargo, muchas de estas proteínas sólo están identificadas a nivel genómico y no hay datos experimentales que ofrezcan más información acerca de su función específica. Ésto es, a diferencia de los resultados de GspD de *E. coli* K-12 y *Klebsiella pneumoniae*, que si tienen un soporte experimental el cual define su función, las demás secuencias de otras bacterias con las que alineó la secuencia de aminoácidos de GspD y GspE, no ofrecieron más datos experimentales que sustenten su función.

Además, cabe señalar que, al realizar la búsqueda de homólogos en el banco de datos del NCBI, no se encontró ninguna proteína homóloga de otras bacterias del Orden de los *Spirochaetales* como *Borrelia*, *Cristispira* o *Treponema* de la Familia *Spirochaetaceae*; ni con *Brachyspira* o *Serpulina* de la Familia *Brachyspiraceae*; ni tampoco con *Leptonema* que comparte Familia con el género *Leptospira* (*Leptospiraceae*). Esto a pesar de que se tienen disponibles los genomas completos de *Borrelia burgdorferi*, *B. garinii*, *Treponema denticola* y *T. pallidum* (NCBI). Resultaría interesante saber si hay alguna identidad entre proteínas del SST-II de *Leptospira biflexa* serovariedad Patoc con homólogos del Orden de los *Spirochaetales*, basándonos en los genomas disponibles, podríamos decir que aparentemente están ausentes en los géneros *Borrelia* y *Treponema* (Fraser *et al.*, 1997, 1998; Glockner *et al.*, 2004; Seshadri *et al.*, 2004). Habrá que esperar la publicación de las secuencias de los demás genomas de otras bacterias clasificadas en el Orden de los *Spirochaetales*, con la finalidad de buscar proteínas relacionadas con el SST-II.

Al no encontrar homólogos de GspD ni de GspE en otras bacterias con investigaciones que nos refieran una función específica de estas proteínas, se decidió seleccionar las 14 bacterias Gram

negativas (*Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia pseudomallei*, *Erwinia chrysanthemi*, *E. carotovora*, *E. coli* K-12, *E. coli* 078:H11, *E. coli* Dysenteriae, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. putida*, *Vibrio cholerae*, *Xanthomonas campestris* y *Yersinia pestis*) donde se han reportado genes del SST-II, con la finalidad de analizar las secuencias de aminoácidos por medio de alineación y así determinar el porcentaje de identidades.

Alineaciones por separado de las secuencias de aminoácidos de GspD y GspE mediante los programas BLAST y ClustalW, con las secuencias de leptospiras patógenas mostraron que hay en promedio, 61.0% de identidad entre GspD de Patoc con las serovariedades Copenhageni, Hardjobovis y Lai. En el caso de GspE hay 71.0% de identidad entre Patoc y las serovariedades patógenas (Cuadro 10).

Al alinear la secuencia de aminoácidos de Patoc con las 14 bacterias Gram negativas, se apreció que hay 25.5% de identidad en promedio por medio de los dos programas (BLAST y ClustalW). En GspE, dado que es más conservada, el promedio de identidades fue ligeramente mayor que en GspD, donde se observó 42.0% de identidad entre las 14 bacterias Gram negativas y la secuencia de Patoc (Cuadro 10).

Las identidades más altas de GspD de Patoc se observaron con las secuencias de *K. pneumoniae* y *E. coli* Dysenteriae, mostrando 28.0% (BLASTp) de indentidad en ambas bacterias, para la secuencia de GspE fue con *V. cholerae* (53.0% BLASTp y 48.0% ClustalW). Con estos resultados, se puede decir que GspD de Patoc tiene mayor identidad con GspD de bacterias de la Familia *Enterobacteriaceae*. La proteína GspE posee mayor identidad con la secuencia de *V. cholerae* que pertenece a la Familia *Vibrionaceae*, ambas familias son clasificadas como γ proteobacterias (Madigan *et al.*, 2004).

Adicionalmente, se realizaron alineaciones múltiples mediante el programa ClustalW entre leptospiras y 14 bacterias Gram negativas con la finalidad de determinar porcentajes de identidades entre estas bacterias. Entre secuencias de aminoácidos de GspD de leptospiras patógenas hay una

alta identidad entre serovariedades de la misma especie, Copenhageni y Lai, 100%, en cambio, entre leptospiras de distintas especies como Hardjobovis con Copenhageni y Lai la identidad es menor (91.0%); entre las serovariedades patógenas con Patoc, se observó una identidad de 61.0%. Con la secuencia de GspE, las identidades fueron muy similares entre serovariedades de la misma especie donde hubo 100% de identidad entre Hardjobovis con Copenhageni, en Lai fue ligeramente menor mostrando 94.0%. Entre las patógenas y Patoc hay 71.0% de identidad en GspE, mayor que con la secuencia de GspD (61.0%). Se puede afirmar que, entre especies patógenas de la misma especie las secuencias de las proteínas GspD y GspE tienen identidad muy alta 100%. Entre serovariedades patógenas de distintas especies las secuencias tienen una identidad alta mostrando identidades mayores al 90.0%. Sin embargo, entre secuencias de *Leptospira* patógenas y apatógenas hay una diferencia considerable, mostrando identidades de alrededor del 60.0%. Estas diferencias entre secuencias de aminoácidos, podrían estar relacionadas con el tipo de productos proteicos a secretar.

Al analizar los resultados únicamente de las bacterias Gram negativas (Apéndice IV), por medio de alineaciones múltiples generadas por el programa ClustalW, en las secuencias de proteínas homólogas de GspD, resultó interesante que entre especies del género *Erwinia* (*E. carotovora*, *E. chrysanthemi*), el porcentaje de identidad no fue muy alto (73.0%). Por otro lado el porcentaje entre *E. coli* O78:H11 y *E. coli* Dysenteriae es más alto (99.0%) que el observado entre *E. coli* K-12 y *E. coli* O78:H11, donde entre ellas existe un porcentaje de 43.0%. Este porcentaje es bajo si consideramos que son bacterias del mismo género y especie. Sin embargo, también se observaron identidades mayores entre bacterias de distintos géneros, como el caso de la identidad entre *E. carotovora* y *K. pneumoniae* (73.0%). Resultado interesante al realizar la alineación múltiple entre secuencias de proteínas homólogas a GspD, que las secuencias de *A. hydrophila*, *B. pseudomallei*, *Ps. aeruginosa* y *Y. pestis*, no fueron reconocidas. Este descarte fue automático con el programa ClustalW. Podría suponerse de antemano que la secuencia del homólogo de GspD de *B. pseudomallei* no fuera reconocida, debido a que taxonómicamente

es una β proteobacteria, a diferencia de las demás que son γ proteobacterias, sin embargo no fue así, ya que *A. hydrophila*, *Ps. aeruginosa* y *Y. pestis* son del mismo grupo (γ proteobacterias) y aun así no fueron reconocidas por el programa de cómputo ClustalW. Finalmente, podemos decir que las secuencias de aminoácidos de los homólogos de GspD poseen regiones conservadas que las identifican como secuencias homólogas, sin embargo, hay diferencias en las secuencias a nivel global, lo cual la hace una proteína poco conservada. Sin embargo, definir si estas diferencias son determinantes para la función de ese tipo de proteína, según el género o especie bacteriana en cuestión, requiere de estudios experimentales que definan las características de las proteínas secretadas.

Los resultados de las alineaciones entre las secuencias homólogas de GspE en bacterias Gram negativas, destacaron las existentes entre *A. hydrophila* y *V. cholerae* (71.0%), y la de más alta identidad que se observó entre *E. coli* O78:H11 y *E. coli* Dysenteriae (97.0%). Entre las especies del género *Erwinia* (*E. carotovora* y *E. chrysanthemi*), existe 80.0% de identidad; entre las especies de *Erwinia* y *K. pneumoniae* hubo 72.0% de identidad. Resultados diferentes como la identidad que hay entre *E. coli* K-12 y *E. coli* O78:H11 que es de 55.0%, resultan interesantes dado que siendo de la misma especie podría esperarse un mayor porcentaje de identidad en una proteína funcional como la secretina del SST-II.

Los resultados producto de la alineación múltiple, son similares entre GspD y GspE, las identidades que se han descrito, entre bacterias de distinto género y bacterias del mismo género parece repetirse. Sin embargo, la alineación múltiple generada por ClustalW en GspD excluye a 4 bacterias (*A. hydrophila*, *B. pseudomallei*, *Ps. aeruginosa*, *Y. pestis*), a diferencia de la alineación múltiple con secuencias homólogas de GspE, donde se incluyeron todas las secuencias (leptospiras y 14 bacterias Gram negativas), estos datos nos confirman que la secuencia de GspE es más conservada que las secuencias de homólogos de GspD.

Por otro lado, resulta interesante como, entre *E. coli* O78:H11 y *E. coli* Dysenteriae hay una alta identidad ($\geq 98.0\%$) entre ambas secuencias (GspD, E). Actualmente *Shigella dysenteriae* se

ha integrado dentro del género *Escherichia* (*E. coli* Dysenteriae) (Adam and Gyles, 2004), se explica en parte el porque de las identidades que existen entre estas dos bacterias, pero es muy contrastante que no se vea el mismo grado de identidad con *E. coli* K-12 y *E. coli* O78:H11.

Igualmente resulta interesante el grado de identidad que existe entre los géneros *Erwinia* y *Klebsiella* (>70.0%), lo cual podría pensarse como un resultado predecible ya que ambas bacterias pertenecen a la misma Familia (*Enterobacteriaceae*). Sin embargo, estos resultados no son similares entre otras bacterias clasificadas dentro de la misma Familia, lo que señala la necesidad de un entendimiento funcional del SST-II, en las distintas bacterias en las que se han reportado este sistema de secreción.

Los dendogramas desarrollados con base en las secuencias de GspD y sus homólogos entre leptospiras y las 14 bacterias Gram negativas, se apreció que las proteínas se clasificaron en 4 grupos (A, B, C y D), a diferencia del dendograma de homólogos de GspE, donde solamente se clasificaron las proteínas en tres grupos (A, B y C).

El grupo (A) clasificó 9 bacterias Gram negativas y dentro de este mismo se agrupan (Figura 11, rama a1) todas las bacterias pertenecientes a la Familia *Enterobacteriaceae* (*Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella* y *Yersinia*), dentro de la rama a1.1 las bacterias que mostraron menor divergencia entre ellas fueron *E. coli* O78:H11 y *E. coli* Dysenteriae (0.00215 y 0.00276, respectivamente). Por lo tanto, existe una relación estrecha entre estas dos bacterias (Figura 11, rama a1.2). Por otro lado, las especies del género *Erwinia* (*E. carotovora* y *E. chrysanthemi*) presentaron una distancia mayor (0.12954 y 0.13507, respectivamente) a la observada en *E. coli* O78:H11 y *E. coli* Dysenteriae. Estos datos resultan interesantes debido a que estas dos especies son del mismo género, por lo tanto se esperaría una distancia menor entre las secuencias. En el grupo B se clasificaron las serovariedades Copenhageni y Lai de *L. interrogans*, Hardjobovis de *L. borgpetersenii* y Patoc de *L. biflexa*. Las serovariedades Copenhageni y Lai mostraron una estrecha relación (0.00229 y 0.00229, respectivamente), a diferencia de la serovariedad Hardjobovis (0.04342), aún más divergente se aprecia la secuencia de la serovariedad

Patoc (0.18992) (Figura 11, rama b1), datos predecibles por las especies a las que pertenecen dichas serovariedades. Cabe señalar que en el mismo grupo (B), también se clasifica la secuencia de *X. campestris* (rama b2), pero con una divergencia mayor (0.39970) al grupo de leptospiras (Figura 11).

En el dendograma de homólogos de GspE, se pueden apreciar tres grupos (A, B y C). En el grupo A se clasifican 7 bacterias Gram negativas, la mayoría de las bacterias (5) clasificadas en este grupo son enterobacterias, solamente no se clasificaron dentro de este grupo las enterobacterias *E. coli* K-12 y *Yersinia* (Figura 12). En la rama a1 se observó que hay una distancia estrecha entre *E. coli* O78:H11 y *E. coli* Dysenteriae (0.00862 y 0.01351, respectivamente). Entre especies del género *Erwinia* (*E. carotovora* y *E. chrysanthemi*) se observó que hay una distancia mayor (0.10225 y 0.09453, respectivamente) comparando con *E. coli* O78:H11 y *E. coli* Dysenteriae. Estos datos resultan interesantes nuevamente debido a que estas dos especies son del mismo género, por lo tanto se esperaría una distancia menor entre las secuencias. En el grupo B a igual que en la Figura 11, en la rama b1.1.2.3 se clasificaron las serovariedades Copenhageni y Lai de *L. interrogans*, Hardjobovis de *L. borgpetersenii* y Patoc de *L. biflexa* (Figura 12). Entre las leptospiras se apreció que existe una estrecha relación entre las serovariedades Copenhageni y Lai, relación aún más estrecha (0.00000 para ambas serovariedades) que la observada en la proteína GspD. Podríamos afirmar que, GspE tiene el mismo origen y no se han presentado cambios evolutivos en *L. interrogans*. Por otro lado se apreció una divergencia con la secuencia de la serovariedad Hardjobovis (0.02889) y aún más divergente la secuencia de Patoc (0.14481) (Figura 12). En la rama b1.1.2 se clasificaron las secuencias del subgrupo de leptospiras (rama b1.1.2.3) y el subgrupo (b1.1.2.4) del género *Pseudomonas* (*Ps. aeruginosa* y *Ps. putida*) con *Xanthomonas*, sin embargo éstas mostraron una mayor divergencia (> 0.2).

Por otro lado, la proteína GspE, está agrupada en dos grandes grupos, el primero incluye un grupo, alinea a homólogos de VirB, TrbB y TadA, componentes del SST-IV, el segundo grupo incluye a los homólogos de PilB, GspE, PilT, PilU, ComG, componentes del sistema de SST-II y

IV, más un grupo no caracterizado de las Archeo bacterias (Planet *et al.*, 2001). Los datos mostraron que los homólogos de la ATPasa agrupados en el SST-II y el SST-IV comparten un ancestro común (Planet *et al.*, 2001). En el caso de la secretina (GspD), resultaría interesante tratar de establecer ancestros comunes para las distintas familias de proteínas con funciones de translocación de productos proteicos a través de las membranas de bacterias Gram positivas y negativas.

La detección de dominios conservados, es una herramienta útil para saber si la proteína tiene homólogos. Al buscar dominios conservados en las secuencias de GspD y GspE, de la serovariedad Patoc se apreció que existen dos regiones conservadas probablemente relacionadas con procesos evolutivos, estructurales y funcionales de la proteína (Figuras 16 y 17).

En la secuencia de GspD se apreció que el domino conservado se localizan en la región carboxilo terminal, ésta determina la identidad entre las proteínas pertenecientes a la familia de las secretinas por ser la parte estructural de la proteína que se encuentra en el interior de la membrana externa y es la responsable de la formación del poro (Yen *et al.*, 2002). La región amino terminal es la que se encuentra es el espacio periplásmico de la bacteria y es la región más variable (Yen *et al.*, 2002). En la secuencia de GspE, se distingue que el domino conservado está distribuido en la región central y sub-carboxilo terminal, debido a que en ésta región hay secuencias de aminoácidos fundamentales denominadas bloque de asparagina (Asp) y bloque de histidina (His), la primera región tiene un arreglo con residuos ácidos y conforman una cavidad (sitio) donde se desarrolla la actividad como ATPasa, similar a otras enzimas como las semejantes a RecA y T7 helicasa (Robien *et al.*, 2003). El segundo bloque (His), presenta residuos conservados en la subfamilia de NTPasas, éste es un elemento expuesto de la proteína adyacente a la cavidad enzimática (sitio activo de ATPasa) y que actúa como un censor de fosfatos (Robien *et al.*, 2003). Dicha región conservada se aprecia en la serovariedad Patoc y en bacterias Gram negativas.

En la predicción de la estructura secundaria, la posición de las hélices α y hojas β , son similares tanto en GspD como en GspE. En GspD de la serovariedad Patoc, se distinguen 11

hélices α y 14 hojas β , en contraste solamente hay 9 hojas β que concuerdan en la alineación, con las hojas β de las leptospiras patógenas. Por otro lado, con las bacterias Gram negativas solamente concuerdan 7 hojas β . El promedio de las hojas β en la familia de las secretinas es de 12 (Yen *et al.*, 2002), tomando en cuenta el número de hojas β que concuerdan en las leptospiras (patógenas y apatógena), se podría afirmar que las secretinas de *Leptospira* requieren de menos hojas β . Sin embargo, la secuencia de aminoácidos en la serovariedad Patoc revela la presencia de 14 hojas β , dos más del promedio de la familia de las secretinas. El número de hojas β es variable en *K. oxytoca* fueron demostradas 13 hojas β en la proteína PulD (GspD) (Guilvout *et al.*, 1999).

Se hace énfasis en las hojas β , porque son fundamentales en todas las familias de las PME relacionadas con la formación de canales o poros a través de la membrana y son las hojas β las que están conservadas en dichas proteínas, en contraste, la region expuesta en la superficie generalmente es la región más variable (Branden and Tooze, 1999; Koebnik *et al.*, 2000; Yen *et al.*, 2002).

En GspE de la serovariedad Patoc se distinguen 16 hélices α y 13 hojas β , de las cuales, 13 hélices α concuerdan con la predicción de dichas estructuras en la secuencia de las serovariedades patógenas de *Leptospira*. Son 11 hojas β en la serovariedad Patoc las que concuerdan con las secuencias en las leptospiras patógenas. Por otro lado, son 10 hélices α y 6 hojas β de la serovariedad Patoc que concuerdan con dichas estructuras con más de tres bacterias Gram negativas. Con base en las alineaciones de homólogos y según el modelo de la ATPasa generado por Robien *et al.* (2003), la ATPasa tiene 14 hélices α (clasificadas de la A-N) y 15 hojas β . Con estos datos, se podría afirmar que las leptospiras (patógenas y la apatógena) tienen el 92.8% de las hélices α y el 84.6% de hojas β al compararlo con el modelo cristalizado de Robien *et al.* (2003). Las estructuras más importantes de toda la secuencia son las hélices α de la D a la I y las hojas β de la 7 a la 12, dichas estructuras secundarias son las que conforman el sitio activo de la enzima (bloque Asp) y el censor de fosfatos (bloque His) (Robien *et al.*, 2003).

En la predicción de la estructura tridimensional, el programa de cómputo 3D-PSSM genera modelos tridimensionales con base en la búsqueda de homólogos en los bancos de datos como el del NCBI. Además de generar un análisis de la estructura secundaria, genera un modelo tridimensional comparándolo con modelos de proteínas que han sido previamente estudiadas mediante cristalografía (Kelley *et al.*, 2000). Por este método, la proteína GspD no fue reconocida con ningún modelo, esto probablemente se debe a que los trabajos publicados en los bancos de datos no existen modelos establecidos para secretinas. Una razón de la ausencia de modelos cristalizados de este tipo de proteínas, es debido a que las PME poseen regiones hidrofóbicas e hidrofílicas en la superficie de la proteína, además no son solubles en soluciones comúnmente utilizadas en cristalografía de proteínas. Sin embargo, pueden ser solubilizadas y purificadas a partir de algunos detergentes, como el octilglucosido (Branden and Tooze, 1999). El proceso de Solubilización de proteínas en detergentes y a partir de ahí purificarlas, es fundamental para generar material protéico necesario para cristalografía. Este paso es importante debido a los componentes hidrofóbicos e hidrofílicos de los detergentes, interactúan con las partes hidrofóbicas e hidrofílicas de la superficie de la proteína, lo cual puede provocar errores en los resultados de la cristalografía de PME (Branden and Tooze, 1999). Sin embargo, se han logrado cristalizar PME como las porinas bacterianas por medio de rayos X de alta resolución (Branden and Tooze, 1999). También se han cristalizado proteínas del SST-II como Eps (Robien *et al.*, 2003) y EpsM (Abendroth *et al.*, 2004) de *Vibrio cholerae* (“*extracellular protein secretion*”). Por otro lado, la secuencia de GspE fue reconocida, con 95.0% de certeza con su homólogo en *V. cholerae* EpsE, en un modelo establecido por cristalografía (Robien *et al.*, 2003).

Los resultados del presente trabajo nos permiten comparar los distintos *loci gsp* en las distintas serovariedades del género *Leptospira*. Por un lado, se sabe que los *loci gsp* en las serovariedades Copenhageni y Lai, son muy similares en el número de MAL, el *locus gsp* de estas dos serovariedades de *L. interrogans* esta conformado por 17 MAL (Figura 22), a diferencia de la serovariedad Hardjobovis de *L. borgpetersenii*, donde el *locus* está compuesto por 14 MAL. Esto

resulta interesante, ya que podría haber diferencias entre el número de MAL de los *loci gsp* entre las especies de *Leptospira* y similitudes entre las distintas serovariedades clasificadas en una especie. Aunque, también cabe la posibilidad de que hubiera similitudes entre serovariedades y serogrupos, en lugar de especies. Considerando lo anterior se abren dos interrogantes ¿Qué función tienen los tres MAL (15, 16 y 17 de *L. interrogans*) ausentes en la serovariedad Hardjobovis (*L. borgpetersenii*)?, ¿Los MAL 15, 16 y 17 presentes en las serovariedades Copenhageni y Lai son fundamentales para la especie *L. interrogans*? y ¿*L. biflexa* conservará la presencia y el orden de los MAL en su *locus gsp*? (Figura 22).

Al buscar homólogos de los distintos MAL que conforman el *loci gsp* de la serovariedad Patoc y de las leptospiros patógenas (Copenhageni, Hardjobovis y Lai) se puede apreciar que el *locus gsp* está compuesto por genes que probablemente codifican para: ATPasa, peptidasa, GspC, GspD, GspE, GspF, GspG, GspH, GspI, GspJ, GspK y PilM (Cuadro 13). Estas proteínas son fundamentales, ya que GspE, F, L, y M (GspL aparentemente ausente en leptospiros) regulan la secreción extracelular y forman una plataforma en la membrana interna. Además, la proteína GspE tiene la función de hidrolizar el ATP y estas proteínas interaccionan con la membrana externa mediante GspC. Las proteínas GspG, H, I, J y K son las encargadas de la formación del *pilus*, también llamadas pseudopilinas y son procesadas por GspO. La mayoría de dichas proteínas (GspC, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O) se localizan en la membrana interna o en el periplasma y están relacionadas con la membrana interna, excepto GspD, que forma el poro o canal de secreción a través de la membrana externa (Lee and Schneewind, 2001; Sandkvist, 2001b). Cabe señalar que aparentemente, en *Leptospira*, están ausentes los genes que codifican para las proteínas GspL, N y O (Figura 22).

Hay diferencias en la serovariedad Copenhageni en la organización del *locus gsp*, en donde el MAL que codifica para GspJ es sustituido por una copia del que codifica para GspG o bien una proteína semejante, con un 39.0% de identidad a la primera. En las tres serovariedades patógenas Copenhageni, Hardjobovis y Lai, el MAL 9 codifica para la pseudopilina GspI con 34.0%, 31.0%

y 35.0% de identidad respectivamente con respecto a GspI de *Dehalococcus* spp (Copenhageni y Lai) y *Ralstonia metallidurans* (Hardjobovis); sin embargo, dichas secuencias también tienen identidad, pero en menor grado, con la pseudopilina GspH (31.0%, 31.0% y 34.0%, respectivamente). El MAL 10 de la serovariedad Copenhageni codifica para pseudopilina GspG (39.0%), en menor grado se observó una identidad de 23.0% para GspJ. En la serovariedad Hardjobovis el mismo MAL (MAL 10, GspJ) muestra identidad de 28.0% con una pilina del SST-IV de *Legionella pneumophila* (Cuadro 13).

A partir del MAL 13, no se encuentran genes que estén claramente asociados al SST-II, sin embargo hay una alta identidad ($\geq 86.0\%$) entre los primeros 14 MAL de las leptospiros patógenas. Es importante señalar que los MAL 14, 15 y 16 de Copenhageni; los MAL 14 y 15 de Lai; así como los MAL 13 y 14 de Hardjobovis. No encontraron ningún homólogo en el banco de datos de la NCBI (Cuadro 13 y 14).

Cabe señalar que, los genes codificados para proteínas de GspC, D, E y F (GspC, F parciales) de la serovariedad Patoc de *L. biflexa*, mantienen una identidad de alrededor del 60.0% con los homólogos de las leptospiros patógenas y aparentemente, el *locus* tiene la secuencia de los MAL igual al de las serovariedades patógenas (Cuadro 14). Por otro lado, resulta interesante que el gen antes del *locus gsp* en las tres serovariedades patógenas, codifica para una quelatasa del magnesio (Cuadro 13). En contraste, las tres serovariedades patógenas, el gen que está después del *locus* es distinto, en Copenhageni el gen codificado a proteína mostró una identidad por medio de BLASTp de 29.0% con un regulador transcripcional de *Ps. aeruginosa*, en Lai hubo una identidad del 71.0% con una reductasa-ribonucleasa de *Bradyrhizobium japonicum* y en Hardjobovis hubo una identidad del 54.0% con una transposasa de *Porphyromonas gingivalis* (Cuadro 13).

Estos datos sugieren que los distintos MAL tienen secuencias conservadas con otros homólogos del SST-II y SST-IV. Sin embargo, faltan estudios funcionales que le den identidad a cada uno de los MAL dentro del SST-II del género *Leptospira*.

El conocimiento de las secuencias de los genes del SST-II de *L. biflexa* serovariedad Patoc, *gspD* y *gspE*, abre la posibilidad para revelar la secuencia completa a corto plazo, del *locus gsp* en este organismo. De igual forma, permitirá iniciar ensayos de mutagénesis dirigida sobre la supuesta secretina, GspD, para evaluar así su papel en la secreción de proteínas en el metabolismo de *Leptospira*, en la adaptabilidad a fuentes de nutrientes y supervivencia bajo distintas condiciones ambientales. Finalmente, en forma indirecta, nos podrá ayudar al entendimiento del papel que este sistema (en particular la secretina) juega en la secreción de productos proteicos en leptospiras patógenas así como la potencial función en la patogenicidad e inmunogenicidad de *Leptospira*.

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica emergente que se presenta en distintas partes del mundo, particularmente en aquellos países que tienen clima húmedo (Bharti *et al.*, 2001; Hartskeerl, 2005). Se caracteriza por ser una enfermedad de difícil diagnóstico y cuyas estrategias de vacunación no están entendidas del todo (Ellis, 2005; Hartskeerl, 2005). El estudio de la genómica y proteómica de *Leptospira*, prometen ser la herramienta para el entendimiento de la patogénesis de la leptospirosis y para el desarrollo de mejores inmunógenos, como por ejemplo vacunas recombinantes, con protección cruzada para el control de esta enfermedad (Hartskeerl, 2005). En la actualidad, son escasas las herramientas para manipulación genética de *Leptospira*. La caracterización de los leptofagos LE1, LE2 y LE3 y la construcción de vectores de tránsito (“*shuttle vector*”) y vectores suicidas han resultado ser herramientas útiles para entender la función de algunos procesos metabólicos y estructuras como el endoflagelo (Saint Girons *et al.*, 1990; Saint Girons *et al.*, 2000; Zuerner *et al.*, 2000; Picardeau *et al.*, 2001). Más recientemente, se ha logrado mutar leptospiras patógenas *L. interrogans*, utilizando un transposón mariner (*Himar1*) creando una colección de mutantes al azar (Bourhy *et al.*, 2005).

9 CONCLUSIONES

9.1 Se identificaron los genes que codifican para GspD y GspE en *L. biflexa* serovariedad Patoc, adicionalmente, también se identificaron parcialmente los genes que codifican para GspC y GspF, genes que también constituyen el *locus gsp* en bacterias Gram negativas.

9.2 Los genes *gspD* y *gspE* de la serovariedad Patoc presentaron una identidad por regiones, con sus homólogos en leptospiras patógenas de 72.0% al 88.0% y una identidad global del 59.0%.

9.3 Las secuencias de aminoácidos de GspD y GspE de la serovariedad Patoc presentaron una identidad con sus homólogos en leptospiras patógenas de alrededor de 61.0% ($\pm 1.0\%$) en GspD y de 71.0% ($+1.0\%$) en GspE.

9.3 La predicción de la estructura terciaria de *gspE* de la serovariedad Patoc, reveló que es muy similar a las ATPasa (EpsE) de *Vibrio cholerae*.

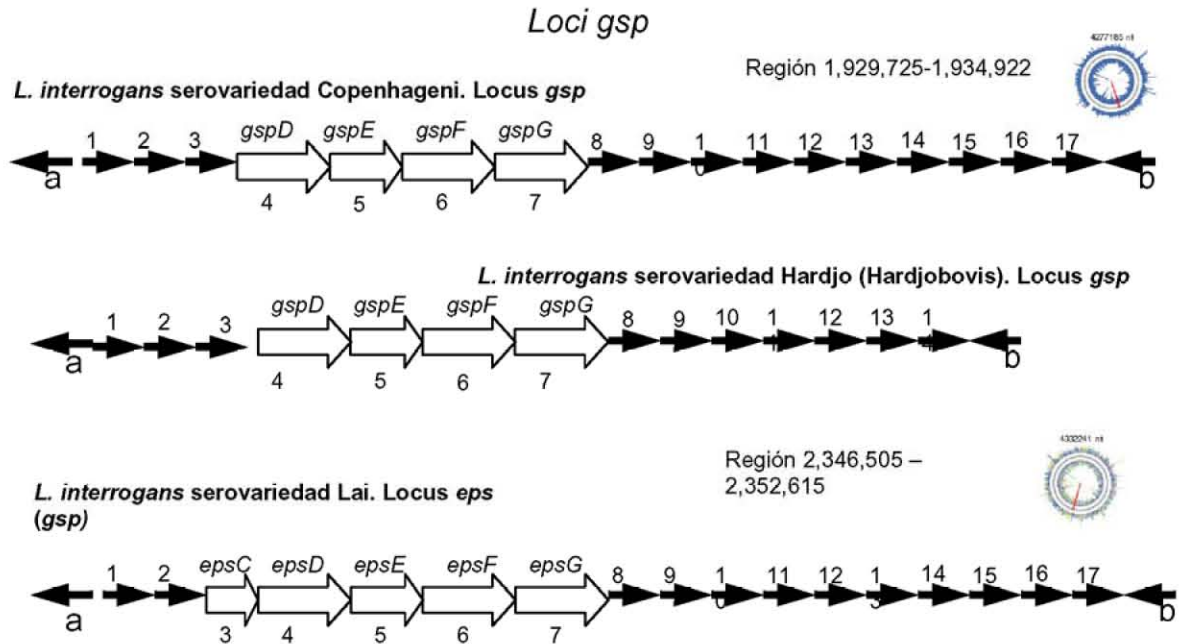


Figura 22. Orientación de los MAL del los loci *gsp* de las serovariedades Copenhageni, Hardjobovis y Lai. Se muestra el sitio relativo que ocupan estos loci en el cromosoma (CI). (NCBI acceso número: NC 005823 y 004242; de la Peña-Moctezuma *et al.*, 2002). Esta figura se complementa con el Cuadro 5.

Cuadro 13. Marcos abiertos de lectura (MAL) que codifican para las proteínas que constituyen los *loci gsp*

marcos abiertos de lectura (MAL) que codifican para las proteínas que constituyen los *loci gsp* de las serovariedades Copenhageni, Hardjobovis, Lai y Patoc; con sus homólogos de las distintas proteínas del NCBI. En la serovariedad Hardjobovis sólo consta de 14 MAL a diferencia Copenhageni y Lai que están constituidos por 17 MAL. Adicionalmente y de forma comparativa, se muestra en la última columna el *locus gsp* en *Escherichia coli* K-12 (NCBI). Cada celda contiene la información: número del MAL con base en el lugar que ocupa en el *locus*; número aminoácidos (aa) de la proteína; porcentaje de identidad seguido del porcentaje de similitud de la proteína; nombre de la proteína con la que hubo identidad; entre paréntesis el número (aa) que alinearon; género y especie de la bacteria con la que hubo identidad. MAL A = el MAL antes del *locus gsp*; MAL D = el MAL después del *locus gsp*; NH = no se encontró homólogo NP = gen no presente en el *loci*.

Cuadro 14. Porcentaje de identidad entre las proteínas codificadas por los distintos MAL del *loci gsp* de *Leptospira*

MAL							MAL								
A	SecA	Nombre (aa)	SecB	Nombre (aa)	%	9	SecA	Nombre (aa)	SecB	Nombre (aa)	%				
	1	Cop	509	2	Hb	286	86	1	Cop	178	2	Lai	178	100	
	1	Cop	509	3	Lai	494	99	1	Cop	178	3	Hb	209	81	
	2	Hb	286	3	Lai	494	81	2	Lai	178	3	Hb	209	81	
1	1	Cop	124	2	Lai	124	99	10	1	Cop	214	2	Lai	214	100
	1	Cop	124	3	Hb	124	90		1	Cop	214	3	Hb	212	88
	2	Lai	124	3	Hb	124	91		2	Lai	214	3	Hb	212	88
2	1	Cop	336	2	Lai	336	100	11	1	Cop	391	2	Lai	458	99
	1	Cop	336	3	Hb	336	87		1	Cop	391	3	Hb	408	85
	2	Lai	336	3	Hb	336	87		2	Lai	458	3	Hb	408	85
3	1	Cop	302	2	Lai	302	100	12	1	Cop	540	2	Lai	540	100
	1	Cop	302	3	Hb	301	87		1	Cop	540	3	Hb	541	87
	1	Cop	302	4	Patoc	124	65		2	Lai	540	3	Hb	541	87
	2	Lai	302	3	Hb	301	87								
	2	Lai	302	4	Patoc	124	65								
	3	Hb	301	4	Patoc	124	64								
4	1	Cop	596	2	Lai	615	100	13	1	Cop	175	2	Lai	175	100
	1	Cop	596	3	Hb	598	91		1	Cop	175	3	Hb	175	89
	1	Cop	596	4	Patoc	595	61		2	Lai	175	3	Hb	175	89
	2	Lai	615	3	Hb	598	91								
	2	Lai	615	4	Patoc	595	61								
	3	Hb	598	4	Patoc	595	60								
5	1	Cop	557	2	Lai	557	100	14	1	Cop	313	2	Lai	313	99
	1	Cop	557	3	Hb	557	94		1	Cop	313	3	Hb	308	86
	1	Cop	557	4	Patoc	558	71		2	Lai	313	3	Hb	308	86
	2	Lai	557	3	Hb	557	94								
	2	Lai	557	4	Patoc	558	71								
	3	Hb	557	4	Patoc	558	72								
6	1	Cop	408	2	Lai	408	100	15	1	Cop	247	2	LaiA	41	24
	1	Cop	408	3	Hb	408	95		1	Cop	247	3	LaiB	40	15
	1	Cop	408	4	Patoc	322	64		2	LaiA	41	3	LaiB	40	10
	2	Lai	408	3	Hb	408	95								
	2	Lai	408	4	Patoc	322	64								
	3	Hb	408	4	Patoc	322	64								
7	1	Cop	158	2	Lai	158	100	16	1	Cop	75	2	Lai	72	8
	1	Cop	158	3	Hb	173	93								
	2	Lai	158	3	Hb	173	93								
8	1	Cop	189	2	Lai	189	99	17	1	Cop	88	2	Lai	181	3
	1	Cop	189	3	Hb	189	91								
	2	Lai	189	3	Hb	189	91								

Porcentaje de identidad entre las proteínas codificadas por los distintos MAL del *loci gsp* en las serovariedades Copenhageni y Lai de *L. interrogans*; Hardjobovis de *L. borgpetersenii* y Patoc de *L. biflexa*, mediante el programa de cómputo ClustalW. Los MAL 4 y 5 corresponden a GspD y GspE, se incluyeron las secuencias parciales de la serovariedad Patoc de GspC y GspF (MAL 3 y 6 respectivamente), para obtener identidades con las otras serovariedades de *Leptospira*. La serovariedad Hardjobovis solo consta de 14 MAL. MAL A = corresponde a un gen que codifica para una quelatasa que está antes de locus de *gsp*, presente en las tres serovariedades patógenas de *Leptospira*

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Hartskeerl RA**. Human Leptospirosis: Current status and future trends. Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society 2005; November 14-15; Chaing Mai. Thailand: International Leptospirosis Society 2005: 39-39.
2. **Levett PN**. Leptospirosis. *C Microbiol Rev* 2001;14: 296-326.
3. **Bharti AR**, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 2003;3:757-771.
4. **Richtzenhain LJ**, Cortez A, Heinemann MB, Martins RS, Miyoshi-Sakamoto S, Vasconcellos SA, Higa ZMM, Scarcelli E, Genovez ME. A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. *Vet Microbiol* 2002;87:139-147.
5. **Ellis WA**. Leptospirosis: Global perspective “Current status and future Trends-Animal”. Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society 2005; November 14-15; Chaing Mai. Thailand: International Leptospirosis Society 2005:40.
6. **Faine S**, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and Leptospirosis. Australia, Melbourne: MediSci, 1999.
7. **Acha PN**, **Szyfres B**. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Vol I. 3^a. ed. E.U.A., Washington DC: OPS, 2001.
8. **Chin J**. El control de las enfermedades transmisibles. 17^a. ed. E.U.A., Washington DC: OPS, 2001.
9. **Brenner DJ**, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:839-858.
10. **Cavalier-Smith T**. The neomuran origin of archaebacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:7-76.
11. **Kmety E**, **Dikken H**. Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovars. Groningen-Netherlands: University Press Groningen, 1993.
12. **Perolat P**, Grimont F, Regnault B, Grimont PA, Fournie E, Thevenet H, Baranton G. rRNA gene restriction patterns of *Leptospira*: a molecular typing system. *Res Microbiol* 1990;141:159-171.
13. **Ramadass P**, Jarvis BD, Corner RJ, Penny D, Marshall RB. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. *Int J Syst Bacteriol* 1992; 42:215-9.
14. **Postic D**, Riquelme-Sertour N, Merien F, Perolat P, Baranton G. Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between *Leptospira* collections: application to *L. meyeri*. *Res Microbiol* 2000;151:333-341.
15. **Farrelly HE**, Adler B, Faine S. Oposonic monoclonal antibodies against lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *J Med Microbiol* 1987;23:1-7.
16. **de la Peña-Moctezuma A**, Bulach DM, Kalambaheti T, Adler B. Comparative analysis the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* subtype Hardjobovis. *FEMS Microbiol Lett* 1999;177:319-326.
17. **Quinn PJ**, Carter ME, Markey B, Carter GR. Clinical Veterinary Microbiology. London: Mosby- Hartcourt Publisher Limited, 1994.
18. **Ritchie AE**, **Ellinghausen HC**. Electron microscopy of leptospire, I. Anatomical features of *Leptospira pomona*. *J Bacteriol* 1965; 89:223-233.
19. **Holt SC**. Anatomy and chemistry of spirochetes. *Microbiol Rev* 1978; 42:114-160.
20. **Bromley DB**, **Charon NW**. Axial filament involvement in the motility of *Leptospira interrogans*. *J Bacteriol* 1979;137:1406-1412.

21. **Picardeau M, Brenot A, Saint Girons I.** First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa flaB* results in non-motile mutants deficient in endoflagella. *Mol Microbiol* 2001;40:189-199.
22. **Faine S, Hoeden JVD.** Virulence-linked colonial and morphological variation in *Leptospira*. *J Bacteriol* 1964; 88:1493-1496.
23. **Adler B, de la Peña-Moctezuma A.** *Leptospira*. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Australia: Blackwell Publishing, 2004:385-396.
24. **Stalheim OVH, Wilson JB.** Leptospiral colonial morphology. *J Bacteriol* 1963;86:482-489.
25. **Wood J, Johnson RC, Palin K.** Surface colonies of *Leptospira interrogans*. *J Clin Microbiol* 1981;13:102-105.
26. **Johnson RC, Harris VG.** Purine analogue sensitivity and lipase activity of leptospires. *Appl Microbiol* 1968;16:1584-1590.
27. **Johnson RC, Harris VG.** Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires, I. Growth at low temperatures. *J Bacteriol* 1967;94:27-31.
28. **Finn MA, Jones RH.** Notes. Growth of saprophytic and pathogenic *Leptospira*: Evaluation of medium, temperature, inoculum, and cost. *Appl Environ Microbiol* 1976; 31:134-137.
29. **Myers DM.** Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis. Centro Panamericano de Zoonosis. Buenos Aires, Argentina: Organización Mundial de la Salud. 1985.
30. **Stalheim OH, Wilson JB.** Cultivation of leptospires I. Nutrition of *Leptospira canicola*. *J Bacteriol* 1964;88:48-54.
31. **Faine S.** Virulence in leptospires III. Comparison of sensitivities of virulent and of avirulent *Leptospira icterohaemorrhagiae* to cultural conditons. *J Bacteriol.* 1959;77:599-603.
32. **Johnson RC, Gary ND.** Nutrition of *Leptospira pomona*. III. Calcium, magnesium, and potassium requirements. *J Bacteriol* 1963;85:983-985.
33. **Johnson RC, Wilson JB.** Nutrition of *Leptospira pomona*. *J Bacteriol* 1960;80:406-411.
34. **Johnson RC, Walby JK.** Cultivation of leptospires: Fatty acid requirements. *Appl Microbiol* 1972;23:1027-1028.
35. **Johnson RC, Walby J, Henry RA, Auran NE.** Cultivation of parasitic leptospires: Effect of pyruvate. *Appl Microbiol* 1973; 26:118-119.
36. **Rodríguez IA, Fors MEC, Puentes JD, Mas MRC.** Nuevo medio de cultivo para el aislamiento de *Leptospira* sp. *Rev Cubana Med Milit* 1998; 27: 44-48.
37. **Griffith ME, Horvath LL, Mika WV, Hawley SJ, Moon JE, Hospenthal DR, Murray CK.** Viability and growth of *Leptospira* in automated blood cultures system media. Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society 2005; November 14-15; Chaing Mai. Thailand: International Leptospirosis Society 2005: 94-95.
38. **Bulach DM, Kalambaheti T, de la Peña-Moctezuma A, Adler B.** The genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in *Leptospira*. In: Saier MH, editor. *The Spirochetes: Molecular and Cellular Biology*. Wymondham UK: Horizon Scientific Press, 2001:45-51.
39. **Kalambaheti T, Bulach DM, Rajakumar K, Adler B.** Genetic organization of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthetic locus of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjjobovis. *Microb Pathog* 1999;27:105-117.
40. **Caroff M, Karibian D, Cavaillon JM, Haeffner-Cavaillon N.** Structural and functional analysis of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes Infect* 2002;4 :915-926.
41. **Isogai E, Isogai H, Kurebayashi Y, Ito N.** Biological activities of *Leptospira* lipopolysaccharide. *Zbl Bakt Hyg* 1986;261:53-64.
42. **Isogai E, Isogai H, Fuji N, Oguma K.** Biological effect of *Leptospira* lipopolysaccharide to mouse B T and NK cells. *Jpn J Vet Sci* 1990;52:923-930.

43. **Nally JE**, Chow E, Fishbein MC, Blanco DR, Lovett MA. Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections. *Infect Immun* 2005;73:3251–3260.
44. **Vinh T**, Adler B, Faine S. Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide extracted from *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. *J Gen Microbiol* 1986;132:103-109.
45. **Que-Gewirth NLS**, Ribeiro AA, Kalb SR, Cotter RJ, Bulach DM, Adler B, Saint Girons I, Werts C, Raetz CRH. A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in *Leptospira interrogans* lipid A, the membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. *J Biol Chem* 2004; 279: 25420-25429.
46. **Vinh T**, Shi MH, Adler B, Faine S. Characterization and taxonomic significance of lipopolysaccharides of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *J Gen Microbiol* 1989;135:2663-2673.
47. **Adler B**, Bulach D, Cullen P, Davies J, Rood J, Coppel R, Seemann T, Zuerner R, Alt D, McGrath A, Wilson P, Kuczek E. What can we learn from comparative genomics of *Leptospira*? Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society 2005; November 14-15; Chaing Mai, Thailand: International Leptospirosis Society 2005:130.
48. **de la Peña-Moctezuma A**, Bulach DM, Adler B. Genetic differences among the LPS biosynthetic loci of serovar of *Leptospira interrogans* and *Leptospira borgpetersenii*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001;31:73-81.
49. **Kalambaheti T**, Wangroongsarb P, Chanket T, Do HL, Gunlabum K, Sateinmethakul P, Jetanadee S, Thaipadungpant J, Wuthiekanum V, Peacock S, Smythe L. Genetic characterization of *Leptospira* isolates based on putative O-antigen polymerase genes and the intergenic region of sugar biosynthetic genes of the *rfb* locus. Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society 2005; November 14-15; Chaing Mai, Thailand: International Leptospirosis Society 2005:304-305.
50. **Bulach MD**, Kalambaheti T, de la Peña-Moctezuma A, Adler B. Functional analysis of genes in the *rfb* locus of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo subtype Hardjobovis. *Infect Immunol* 2000; 68:3793-3798.
51. **de la Peña-Moctezuma A**. Studies on the genetic organisation of the *rfb* loci of *Leptospira interrogans* serovars. (Doctorale thesis). Australia Melbourne, Victoria: Monash Melbourne University, 2002.
52. **Carrillo-Casas EM**, Bulach DM, Adler B, de la Peña-Moctezuma A. Regulation of transcription by the *orfJ14-orfJ15* intergenic region of the Hardjoprajitno *rfb* locus. Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society 2005; November 14-15; Chaing Mai, Thailand: International Leptospirosis Society 2005:138-139.
53. **Haake DA**. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiol* 2000;146:1491–1504.
54. **Zuerner R**, Haake D, Adler B, Segers R. Technological advances in the molecular biology of *Leptospira*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2000;2:455-462.
55. **Haake DA**, **Matsunaga J**. Leptospirosis membrane proteins - variations on a theme? *Indian J Med Res* 2005;121:143-145.
56. **Haake DA**, Walker EM, Blanco DR, Bolin CA, Miller JN, Lovett MA. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar grippityphosa during *in vitro* cultivation. *Infect Immun* 1991;59:1131-1140.
57. **Zuerner RL**, Knudtson W, Bolin CA, Trueba G. Characterization of outer membrane and secreted proteins of *Leptospira interrogans* serovar pomona. *Microb Pathog* 1991;10:311-322.

58. **Haake DA**, Champion C, Martinich C, Shang ES, Blanco DR, Miller JN, Lovett MA. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. *J Bacteriol* 1993;175:4225-4234.
59. **Nicholson VM**, **Prescott JF**. Outer membrane proteins of three pathogenic *Leptospira* species. *Vet Microbiol*. 1993;36:123-138.
60. **Haake DA**, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* 2000; 68:2276–2285.
61. **Lee SH**, Kim KA, Park YG, Seong IW, Kim MJ, Lee YJ. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Gene*. 2000;254:19-28.
62. **Zhang XY**, Yu Y, He P, Zhang YX, Hu BY, Yang Y, Nie YX, Jiang XG, Zhao GP, Guo XK. Expression and comparative analysis of genes encoding outer membrane proteins LipL21, LipL32 and OmpL1 in epidemic leptospires. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2005;37: 649–656.
63. **Guerreiro H**, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Reis MG, Levett PN, Ko AI, Haake DA. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun* 2001;69:4958–4968.
64. **Shang ES**, Exner MM, Summers TA, Martinich C, Champion CI, Hancock REW, Haake DA. The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. *Infect Immun* 1995; 63:3174–3181.
65. **Barnett JK**, Barnett D, Bolin CA, Summers TA, Wagar EA, Cheville NF, Hartskeerl RA, Haake DA. Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. *Infect Immun* 1999;67:853–861.
66. **Shang ES**, Summers TA, Haake DA. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun* 1996;64:2322–2330.
67. **Natarajaseenivasan K**, Vijayachari P, Sharma S, Sugunan AP, Sehgal SC. Phenotypic and genotypic conservation of OmpL1 & LipL41 among leptospiral isolates of Andaman Islands. *Indian J Med Res* 2005; 122:343-347.
68. **Matsunaga J**, Young TA, Barnett JK, Barnett D, Bolin CA, Haake DA. Novel 45-Kilodalton leptospiral protein that is processed to a 31-Kilodalton growth-phase-regulated peripheral membrane protein. *Infect Immun* 2002;70:323-334.
69. **Haake DA**, Martinich C, Summers TA, Shang ES, Pruetz JD, Mc Coy AM, Mazel MK, Bolin CA. Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection. *Infect Immun* 1998;66:1579-1587.
70. **Mèrien F**, Truccolo J, Baranton G, Perolat P. Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 185:17-22.
71. **Cullen PA**, Haake DA, Bulach DM, Zuerner RL, Adler B. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun* 2003;71:2414-2421.
72. **Nally JE**, Timoney JF, Stevenson B. Temperature-regulated protein synthesis by *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 2001;69:400-404.
73. **Hsieh WJ**, Chang YF, Chen CS, Pan MJ. Omp52 is a growth-phase-regulated outer membrane protein of *Leptospira santarosai* serovar Shermani. *FEMS Microbiol Lett* 2005;243:339-345.
74. **Pol Sea S**, **Bharadwaj Renu S**. P-50: New HPLC purified “candidate” antigen. Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society 2005; November 14-15; Chaing Mai. Thailand: International Leptospirosis Society 2005:71-72.

75. **Cullen PA**, Cordwell SJ, Bulach DM, Haake DA, Adler B. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect Immun* 2002;70:2311–2318.
76. **Sandkvist M**. Type II secretion and pathogenesis - Minireview. *Infect Immun* 2001; 69:3523-3535.
77. **de la Peña-Moctezuma A**, Cullen PA, Bulach DM, Adler B. pL 18, a novel OMP is encoded in a locus homologous to the Type II secretion pathway system of *E. coli*. Proceedings of the 3th Scientific Meeting, International Leptospirosis Society; 2002 October 28-30. Bridgetown, Barbados.
78. **Rodríguez-Reyes EA**, Cullen PA, Bulach DM, Haake DA, Adler B, de la Peña-Moctezuma. Expression of gspD_L a type II secretion system protein from *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo (Hardjobovis). Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society 2005; November 14-15; Chaing Mai. Thailand: International Leptospirosis Society 2005:294-295.
79. **Matsunaga J**, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sanchez Y, Siqueira I, Bolin CA, Reis MG, Riley LW, Haake DA, Ko AI. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microbiol* 2003;49:929-945.
80. **Palaniappan RUM**, Chang YF, Jusuf SSD, Artiushin S, Timoney JF, McDonough SP, Barr SC, Divers TJ, Simpson KW, McDonough PL, Mohammed HO. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 2002;70:5924-5930.
81. **Matsunaga J**, Sanchez Y, Xu X, Haake DA. Osmolarity, a key environmental signal controlling expression of leptospiral proteins LigA and LigB and the extracellular release of LigA. *Infect Immun* 2005;73:70-88.
82. **Koizumi N**, **Watanabe H**. Molecular cloning and characterization of a novel leptospiral lipoprotein with OmpA domain. *FEMS Microbiol Lett* 2003;226:215-219.
83. **Nally JE**, Whitelegge JP, Aguilera R, Pereira MM, Blanco DR, Lovett MA. Purification and proteomic analysis of outer membrane vesicles from a clinical isolate of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Proteomics* 2005;5:144-152.
84. **Haake DA**, **Matsunaga J**. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. *Infect Immun* 2002;70:4936-4945.
85. **Cullen PA**, Xu X, Matsunaga J, Sanchez Y, Ko AI, Haake DA, Adler B. Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infect Immun* 2005;73:4853-4863.
86. **Cullen PA**, Cordwell SJ, Adler B, Cameron CE. The leptospiral surfaceome and glycoproteome. Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society 2005; November 14-15; Chaing Mai. Thailand: International Leptospirosis Society 2005:112-113.
87. **Haake DA**, Suchard MA, Kelley MM, Dundoo M, Alt DP, Zuerner RL. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. *J Bacteriol* 2004;186:2818–2828.
88. **Haake DA**, **Matsunaga J**. Sequence analysis, location, and surface-exposure of leptospiral outer membrane proteins. Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society 2005; November 14-15; Chaing Mai. Thailand: International Leptospirosis Society 2005:131.
89. **Nally JE**, Whitelegge JP, Blanco DR, Lovett MA. Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* during acute lethal infection of Guinea pigs. Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society 2005; November 14-15; Chaing Mai. Thailand: International Leptospirosis Society 2005:110-111.

90. **Wang B**, Sullivan J, Sullivan GW, Mandell GL. Interaction of leptospire with human polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun* 1984;44:459-464.
91. **Wang B**, Sullivan JA, Sullivan GW, Mandell GL. Role of specific antibody in interaction of leptospire with human monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infect Immun* 1984; 46:809-813.
92. **Cinco M**, Stefanel P, Domenis R, Presani G, Perticarari S, Blasi E. Interaction between *Leptospira* and microglial cells. Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society 2005; November 14-15; Chaing Mai. Thailand: International Leptospirosis Society 2005:273.
93. **Dobrina A**, Nardon E, Vecile E, Cinco M, Patriarca P. *Leptospira icterohaemorrhagiae* and leptospire peptidoglycans induce endothelial cell adhesiveness for polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1995; 63: 2995–2999.
94. **Mèrien 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; 65:729–738.
95. **Diament D**, Brunialti MKC, Romero EC, Kallas EG, Salomao R. Peripheral blood mononuclear cell activation induced by *Leptospira interrogans* glycolipoprotein. *Infect Immun* 2002; 70: 1677-1683.
96. **del Real G**, Segers RPAM, van der Zeijst BAM, Gaastra W. Cloning of a hemolysin gene from *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Infect Immun* 1989;57:2588-2590.
97. **Segers RPAM**, van der Drift A, De Nijs A, Corcione P, van der Zeijst BAM, Gaastra W. Molecular analysis of a sphingomyelinase C gene from *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Infect Immun* 1990;58:2177-2185.
98. **Lee SH**, Kim S, Park SCh, Kim MJ. Cytotoxic activities of *Leptospira interrogans* hemolysin SphH as a pore-forming protein on mammalian cells. *Infect Immun* 2002; 70:315-322.
99. **Zhang YX**, Geng Y, Bi B, He JY, Wu ChF, Guo XK, Zhao GP. Identification and classification of all potential hemolysin encoding genes and their products from *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae serovar Lai. *Acta Pharmacologica Sinica* 2005;26:453-461.
100. **Hauk P**, Negrotto S, Caló ER, Arruda SV, Élide MG, Ward RJ, Schattner M, Martín RG, Lee PH. Expression and characterization of HlyX hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni: Potentiation of hemolytic activity by LipL32. *Biochem Biophys Res Comm* 2005; 333: 1341-1347.
101. **Burth P**, Younes-Ibrahim M, González FHFS, Costa ER, Castro MVCF. Purification and characterization of a Na⁺, K⁺ ATPase inhibitor found in an endotoxin of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 1997;65:1557-1560.
102. **Patarakul K**, Chirathaworn C, Singhswan V, Saksit V, Thiphonggraphap S. Binding of pathogenic and non-pathogenic leptospire to extracellular matrix proteins. Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society 2005; November 14-15; Chaing Mai. Thailand: International Leptospirosis Society 2005:272.
103. **Charon NW**, **Goldstein SF**. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: The Spirochetes. *Annu Rev Genet* 2002;36:47-73.
104. **Li ZH**, Dong K, Yuan JP, Sun JC, Hu BY, Zhao GP, Guo XK. Identification of *cheW* and *cheY* genes in *Leptospira interrogans* serovar Lai strain Lai. Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society 2005; November 14-15; Chaing Mai. Thailand: International Leptospirosis Society 2005:147-148.
105. **Trueba G**, Zapata S, Madrid K, Cullen P, Haake D. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Internat Microbiol* 2004;7:35-40.
106. **Trueba G**, Zapata S, Madrid K, Peñafiel N. Adaptación de *Leptospira interrogans* (sensu stricto) al agua dulce. *Rev Cubana Med Trop* 2002;54:11

107. **Picardeau M**, Ren S, Saint Girons I. Killing effect and antitoxic activity of the *Leptospira interrogans* toxin-antitoxin system in *Escherichia coli*. J Bacteriol 183:6494-6497.
108. **Zhang YX**, Guo XK, Wu C, Bi B, Ren SX, Wu CF, Zhao GP. Characterization of a novel toxin-antitoxin module, VapBC, encoded by *Leptospira interrogans* chromosome. Cell Res 2004; 14:208-216.
109. **Jost BH**, Adler B, Faine S. Experimental immunisation of hamsters with lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans*. J Med Microbiol 1989; 29:115-120.
110. **Cabezas AH**, Cabezas GO, Bencomo FL, Pérez QQ. Aislamiento de la cepa del complejo patógeno Bataviae en paciente vacunado contra Copenhageni, Canicola y Mozdok. Rev Cubana Med Trop 2005;57:73-74.
111. **Koizumi N**, **Watanabe H**. Leptospirosis vaccines: Past, present, and future. J Postgrad Med 2005;51:210-214.
112. **Gavaldón-Rosas DG**, Rojas-Serranía N, Cadena-López JG, Gónzales-Daydaron MA, Moles-Cervantes LP. Serological and clinical leptospirosis in vaccinated dogs en México city. Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society 2005; November 14-15; Chaing Mai. Thailand: International Leptospirosis Society 2005:336-337.
113. **Luna-Álvarez M**, Moles-Cervantes PL, Torres-Barranca JI, Salazar GF, Urrutia VRM, Nava VC. Leptospirosis canina. Memorias “Simposio internacional sobre *Leptospira* y Leptospirosis en las Américas, México 2004”; 2004 febrero 2-4; D.F. México. México (DF): UNAM-FMVZ, UAM-Xochimilco, INDRE-SSA, CENID-Microbiología-INIFAP, SENASICA-SAGARPA. 2004:45-61.
114. **Moles-Cervantes PL**. Leptospirosis porcina. Experiencias en un brote de leptospirosis porcina. Memorias “Simposio internacional sobre *Leptospira* y Leptospirosis en las Américas, México 2004”; 2004 febrero 2-4; D.F. México. México (DF): UNAM-FMVZ, UAM-Xochimilco, INDRE-SSA, CENID-Microbiología-INIFAP, SENASICA-SAGARPA. 2004:62-64.
115. **Ellis WA**. Bovine leptospirosis: cost, treatment and control. Memorias “Simposio internacional sobre *Leptospira* y Leptospirosis en las Américas, México 2004”; 2004 febrero 2-4; D.F. México. México (DF): UNAM-FMVZ, UAM-Xochimilco, INDRE-SSA, CENID-Microbiología-INIFAP, SENASICA-SAGARPA. 2004:65-69.
116. **Bidhendi SM**, Vandyousefi J, Khaki P. Preparation and standardization of trivalent *Leptospira* vaccine in sheep and cattle. Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society 2005; November 14-15; Chaing Mai. Thailand: International Leptospirosis Society 2005:344.
117. **Fernández YR**, Pino YN, Aranguren YM, González AR, Padrón MA, Valdés Y. Solubilización de los componentes de la membrana externa de *Leptospira interrogans* serovar Mozdok mediante desoxicolato de sodio y tritón X-100 y evaluación de su capacidad inmunogénica y protección homóloga y heteróloga inducida en hámsteres. Rev Cubana Med Trop 2005;57:53-54.
118. **Gavaldón-Rosas DG**, Fuentevilla DO, Moles-Cervantes PL, Torres-Barranca J, Rojas-Serranía N, Cadena-López JG. Kinetic of the humoral immune response in rabbits to a *Leptospira* vaccine with different concentration of adjuvant. Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society 2005; November 14-15; Chaing Mai. Thailand: International Leptospirosis Society 2005:338-339.
119. **Klaasen HBLM**, van der Veen M, Vrijenhoek MP. Protection of dogs with Nobivac Lepto vaccine against renal infection with *Leptospira interrogans* serovars Canicola and Icterohaemorrhagiae is dose-dependent. Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society 2005; November 14-15; Chaing Mai. Thailand: International Leptospirosis Society 2005:347.

120. **Haake DA**, Mazel MK, Mc Coy AM, Milward FGC, Matsunaga J, Wagar EA. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun* 1999;67:6572–6582.
121. **Branger C**, Sonrier C, Chatrenet B, Klonjkowski B, Ruvoen-Clouet N, Aubert A, André-Fontaine G, Eliot M. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. *Infect Immun* 2001;69:6831-6838.
122. **Artornurasook S**, Pengpanich U, Junsong N, Ramasoota P, Ekpo P. Production and characterization of monoclonal antibody specific to *Leptospira* flagellin. Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society 2005; November 14-15; Chaing Mai. Thailand: International Leptospirosis Society 2005:348-349.
123. **Gaudart N**, Chootong P, Kongpila S, Chansong N, Rungpanich U, Supattamongkoi Y, Suwancharoen D, Poonsuksombath D, Ekpo P. Potent cross-reactive neutralizing monoclonal antibodies against *Leptospira interrogans* infection to Vero cell. Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society 2005; November 14-15; Chaing Mai. Thailand: International Leptospirosis Society 2005:345-346.
124. **Brown RA**, Blumerman S, Gay C, Bolin C, Duby R, Baldwin CL. Comparison of three different leptospiral vaccines for induction of a type 1 immune response to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. *Vaccine* 2003; 21:4448-4458.
125. **Bolin CA**, Alt DP. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. *Am J Vet Res* 2001;62:995-1000.
126. **Naiman BM**, Blumerman S, Alt D, Bolin CA, Brown R, Zuerner R, Baldwin CL. Evaluation of type 1 immune response in naive and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: involvement of WC1(+) gammadelta and CD4 T cells. *Infect Immun*. 2002 Nov; 70:6147-57.
127. **World Health Organization**. Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. World Health Organization. Malta, 2003.
128. **López-Pérez M**, Ortega CS, Atilano DL, de la Peña-Moctezuma A. Detección de anticuerpos contra *Leptospira* en equinos dedicados a la producción de sueros hiperinmunes. *Vet Mex* 1998; 29:173-179.
129. **Granito A**, Ballardini G, Fusconi M, Volta U, Muratori P, Sambri V, Battista G, Bianchi FB. A case of leptospirosis simulating colon cancer with liver metastases. *World J Gastroenterol* 2004;10:2455-2456.
130. **Uzala FA**, Dobrenovb B, Smythec L, Norrisc M, Dohntc M, Symondsc M, O'Boylea D, Schoutena F, Kelly WR. Short communication. A study of "white spotted kidneys" in cattle. *Vet Microbiol* 2002;86:369–375.
131. **Haake DA**, Dundoo M, Cader R, Kubak BM, Hartskeerl RA, Sejvar JJ, Ashford DA. Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis. *Clin Infect Dis* 2002;34:40-43.
132. **Heuer C**, Dorjee S, Ridler A, Ayanegui-Alcérreca MA, Collins-Emerson JM, Midwinter A, Wets D, Jackson R, Wilson P. Human occupational leptospirosis attributable to livestock exposure. Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society 2005; November 14-15; Chaing Mai. Thailand: International Leptospirosis Society 2005:156-157.
133. **Meeyam T**, Tablerk P, Petchanok B, Pichpol D, Padungtod P. Seroprevalence and risk factor associated with leptospirosis in dog. Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society 2005; November 14-15; Chaing Mai. Thailand: International Leptospirosis Society 2005:324.
134. **Koizumi N**, Uchida M, Obe H, Hoshino M, Tanikawa T, Makino T, Watanabe H. Isolation and characterization of *Leptospira spp.* from feral animals in the Tokyo metropolitan area, Japan. Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society

- 2005; November 14-15; Chaing Mai. Thailand: International Leptospirosis Society 2005:320-321.
135. **Niwattayakul K**, Pimada K, Hoontrakul S, Chueasuwanchai S, Suthinond C, Charoenwat S, Losuwanaluk K, Silpasakorn S, Suwanchaoren D, Chierakul W, Chenchittikul M, Suputtamongkol Y. Empirical antimicrobial therapy for suspected leptospirosis. Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society 2005; November 14-15; Chaing Mai. Thailand: International Leptospirosis Society 2005:80-81.
 136. **Bajani MD**, Ashford DA, Bragg SL, Woods CW, Aye T, Spiegel RA, Plikaytis BD, Perkins BA, Phelan M, Levett PN, Weyant RS. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 2003;41:803-809.
 137. **Levett PN**. Diagnostic challenges: Changing the paradigm from serological to molecular diagnosis. . Proceedings of the 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society 2005; November 14-15; Chaing Mai. Thailand: International Leptospirosis Society 2005:58.
 138. **Cole JR Jr**, Sulzer CR, Pursell AR. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl Microbiol* 1973;25:976-980.
 139. **Cumberland P**, Everard CO, Levett PN. Assessment of the efficacy of an IgM-elisa and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61:731-734.
 140. **Madigan MT**, Martinko JM, Paerker J. Brock. *Biología de los Microorganismos*. 3^a ed. España: Person Educación, 2004.
 141. **Ren SX**, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF, Jiang HQ, Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z, Sheng HH, Yin HF, Zhang Y, Zhu GF, Wan M, Huang HL, Qian Z, *et al.*. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 2003;422:888-893.
 142. **Nascimento ALTO**, Verjovski-Almeida S, Van Sluys MA, Monteiro-Vitorello CB, Camargo LEA, Digiampietri LA, Harstkeerl RA, Ho PL, Marques MV, Oliveira MC, Setubal JC, Haake DA, Martins EAL. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Brazilian J Med Biol Res* 2004; 37:459-478.
 143. **Nascimento ALTO**, Ko AI, Martins EAL, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, Verjovski- Almeida S, Hartskeerl RA, Marques MV, Oliveira MC, Menck CFM, Leite LCC, Carrer H, Coutinho LL, Degraeve WM, Dellagostin OA, El-Dorry H, Ferro ES, Ferro MIT, Furlan LR, Gamberini M, Giglioti EA, Góes-Neto A, Goldman GH, *et al.*. comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J Bac* 2004;186:2164- 2172.
 144. **Saint Girons I**, Margarita D, Amouriaux P, Baranton G. First isolation of bacteriophage for a spirochaete: potential genetic tools for *Leptospira*. *Res Microbiol* 1990;141:1131-1138.
 145. **Bourhy P**, Frangeul L, Couvé E, Glaser P, Saint Girons I, Picardeau M. Complete nucleotide sequence of the LE1 prophage from the spirochete *Leptospira biflexa* and characterization of its replication and partition functions. *J Bacteriol* 2005; 187:3931–3940.
 146. **Saint Girons I**, Bourhy P, Ottone C, Picardeau M, Yelton D, Hendrix RW, Glaser P, Charon N. The LE1 bacteriophage replicates as a plasmid within *Leptospira biflexa*: Construction of an *L. biflexa*-*Escherichia coli* shuttle vector. *J Bacteriol* 2000;182: 5700-5705.
 147. **Picardeau M**, Brenot A, Saint Girons I. First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa flaB* results in non-motile mutants deficient in endoflagella. *Mol Microbiol* 2001;40:189-199.

148. **Picardeau M**, Bauby H, Saint Girons I. Genetic evidence for the existence of two pathways for the biosynthesis of methionine in the *Leptospira* spp. FEMS Microbiol Lett 2003;225:257-262.
149. **Bauby H**, Saint Girons I, Picardeau M. Construction and complementation of the first auxotrophic mutant in the spirochaete *Leptospira meyeri*. Microbiol 2003;149:689-693.
150. **Louvel H**, Saint Girons I, Picardeau M. Isolation and Characterization of FecA- and FeoB-mediated iron acquisition systems of the spirochete *Leptospira biflexa* by random insertional mutagenesis. J Bac 2005;187:3249-3254.
151. **Bourhy P**, Louvel H, Saint Girons I, Picardeau M. Random insertional mutagenesis of *Leptospira interrogans*, the agent of leptospirosis, using a *mariner* transposon. J Bacteriol 2005;187:3255-3258.
152. **Thanassi DG**, **Hultgren SJ**. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. Curr Op Cell Biol 2000; 12:420-430.
153. **Lee VT**, **Schneewind O**. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. Genes and Develop 2001; 15:1725-1752.
154. **Tauschek M**, Gorrell RJ, Strugnell RA, Robins-Browne RM. Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. Proc Nat Acad Sci USA 2002; 99: 7066- 7071.
155. **Rossier O**, Starjenburg SR, Cianciotto NP. *Legionella pneumophila* type II Protein secretion promotes virulence in the A/J mouse model of legionnaires disease pneumonia. Infect Immun 2004; 72: 310-321.
156. **Francetic O**, Belin D, Badaut C, Pugsley AP. Expression of the endogenous type II secretion pathway in *Escherichia coli* leads to chitinase secretion. EMBO J 2000; 19: 6697-6703.
157. **Driessen AJ**, Manting EH, van der Does C. The structural basis of protein targeting and translocation in bacteria. Nat Struct Biol 2001;8:492-498.
158. **Sandkvist M**. Biology of type II secretion - Microreview. Mol Microbiol 2001; 40:271-283.
159. **Lory S**. Secretion of proteins and assembly of bacterial surface organelles: Shared pathway of extracellular protein targetin. Curr Op Microbiol 1998; 1:27-35.
160. **Peabody CR**, Chung YJ, Yen MR, Vidal-Ingigliardi D, Pugsley AP, Saier M. Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archeal flagella. Microbiol 2003; 149:3051-3972.
161. **Ausubel FM**, Brent R, Kingston RE, Moore DM, Seldman JG, Smith JA, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. USA: John Wiley and Sons, 1993.
162. **Sambrook J**, **Russell DW**. Molecular Cloning, laboratory manual. 3th ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
163. **Shyamala V**, Ferro-Luzzi AG. Genome walking by single-specific-primer polymerase chain reaction SSP-PCR. Gene 1989;84:1-8.
164. **Gómez PP**, **Valencia A**. Predicción de estructura de proteínas. En: Gómez MCC, Sancho JS. Estructura de proteínas. España: Ariel, 2003:391-41.
165. **Robien MA**, Krumm BE, Sandkist M, Hol WGJ. Crystal Structure of the extracellular protein secretion NTPase Eps of *Vibrio cholerae*. J Mol Biol 2003;333: 657-674.
166. **Yen MR**, Peabody CR, Partovi SM, Zhai Y, Tseng YH, Saier MH. Protein-translocation outer membrane porins of Gram-negative bacteria. Biochim Biophys Acta 2002;1562:6-31.
167. **Fraser CM**, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb JF, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Palmer N, Adams MD, Gocayne J, *et al*. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. Nature 1997;390:580-586.

168. **Fraser CM**, Norris SJ, Weinstock GM, White O, Sutton GG, Dodson R, Gwinn M, Hickey EK, Clayton R, Ketchum KA, Sodergren E, Hardham JM, McLeod MP, Salzberg S, Peterson J, Khalak H, Richardson D, Howell JK, Chidambaram M, Utterback T, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Cotton MD, *et al.* Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science* 1998;281:375-388
169. **Glockner G**, Lehmann R, Romualdi A, Pradella S, Schulte-Spechtel U, Schilhabel M, Wilske B, Suhnel J, Platzer M. Comparative analysis of the *Borrelia garinii* genome. *Nucleic Acids Res* 2004;32:6038-6046.
170. **Adam T, Gyles CL.** *E. coli* Shigella. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Australia: Blackwell Publishing, 2004:169-184.
171. **Planet PJ**, Kachlany SC, DeSalle R, Figurski DH. Phylogeny of genes for secretion NTPases: identification of the widespread tadA subfamily and development of a diagnostic key for gene classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:2503-2508.
172. **Guilvout I**, Hardie KR, Sauvonnet N, Pugsley AP. Genetic dissection of the outer membrane secretin PulD: are there distinct domains for multimerization and secretion specificity? *J Bacteriol* 1999;181:7212-20.
173. **Branden C, Tooze J.** Introduction to protein structure. 2nd ed. USA: Garland Publishing, 1999.
174. **Koebnik R**, Locher KP, Van Gelder P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* 2000;37:239-253.
175. **Kelley LA**, MacCallum RM, Sternberg MJ. Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM. *J Mol Biol* 2000;299:499-520.
176. **Abendroth J**, Rice AE, McLuskey K, Bagdasarian M, Hol WGJ. The Crystal Structure of the Periplasmic Domain of the Type II Secretion System Protein EpsM From *Vibrio cholerae*: The Simplest Version of the Ferredoxin Fold. *J Mol Biol.* 2004;338:585-96.

APÉNDICE I

Medio de fracción V de albúmina sérica bovina-polisorbato 80 EMJH (Myers, 1985).

Albúmina sérica bovina-polisorbato (EMJH)	Proporciones:
<ul style="list-style-type: none"> • Medio basal: 	
Agua destilada	900 ml
Fosfato disódico, anhidro (Na_2HPO_4) ¹	
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) ¹	1.0 g
Cloruro de sodio (NaCl) ¹	0.3 g
Cloruro de amonio (NH_4Cl) ¹	1.0 g
Tiamina HCL (Vitamina, B1) ¹	1.0 ml (solución stock 25.0g/100ml)
Piruvato de sodio ($\text{CH}_3\text{COCOONa}$) ²	1.0 ml (solución stock 5.0g/100ml)
Glicerina ($\text{CH}_3\text{H}_5\text{-OH}_3$) ³	1.0 ml (solución stock 10.0g/100ml)
(esterilizar por autoclave)	1.0 ml (solución stock 10g/100ml)
<ul style="list-style-type: none"> • pH 7.2 – 7.4. • Una vez esterilizada la base, dejar enfriar y posteriormente adicionar el suplemento. 	
<ul style="list-style-type: none"> • Suplemento de albúmina (esterilizar por filtración): 	
Agua	
Albúmina sérica bovina ⁴	50.0 ml
Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ³	10.0 g
Cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ³	1.0 ml (solución stock 1.5g/100ml)
Sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ³	1.0 ml (solución stock 1.5g/100ml)
Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ³	1.0 ml (solución stock 0.4g/100ml)
Cianocobalamina (Vitamina, B12) ⁴	10.0 ml (solución stock 0.5g/100ml)
Polisorbato 80 (Tween)	1.0 ml (solución stock 0.02 g/100ml)
c.b.p. 100 ml.	12.5 ml (solución stock 0.0g/100ml)
<ul style="list-style-type: none"> • La filtración: primero con membrana de 0.65, 0.45 y finalmente con 0.22 μm.⁵ 	

¹ Base para medio EMJH, Difco TM, EUA.

² Fluka AG, Suiza.

³ JT Baker, EUA.

⁴ SIGMA Aldrich, EUA.

⁵ Millipore, EUA.

Medios para cultivo de leptospiras	Proporciones
Fletcher Peptona Extracto de carne Cloruro de sodio (NaCl) Agar Agua destilada Suero de conejo	0.3 g 0.2 g 0.5 g 1.5 g 920 ml 3 a 10%
Stuart L-asparagina Cloruro de amonio (NH ₄ Cl) Cloruro de magnesio (MgCl ₂ 6H ₂ O) Cloruro de sodio (NaCl) Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄) Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄) Rojo de fenol Agua destilada Glicerina Suero de conejo	0.132 g 0.286 g 0.406 g 1.808 g 0.666 g 0.087 g 0.01 g 995 ml 5 ml 8 a 10%
Korthof Peptona Cloruro de sodio (NaCl) Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃) Cloruro de potasio (KCl) Cloruro de calcio (CaCl ₂) Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄) Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄) Agua destilada Suero de conejo	0.8 g 1.4 g 0.02 g 0.04 g 0.04 g 0.24 g 0.88 g 1,000 ml 8 a 10%

Fórmulas y proporciones para elaborar los medios Fletcher, Stuart y Korthof. El suero de conejo debe esterilizarse por filtración (0.45 µm y 0.22 µm) e inactivarse a 56° C durante 30 min. El agua con las sales debe esterilizarse aparte por autoclaveado antes de adicionar el suero (Myers, 1985).

APÉNDICE II

Soluciones (Ausubel *et al.*, 1993):

Cloruro de sodio 5 M (NaCl).¹

En 1,000 ml disolver

292 g NaCl

Esterilizar por autoclave

Bromuro de etidio (10 mg/ml).²

Disolver 0.2 g en 20 ml de H₂O

Mezclar y almacenar en oscuridad

Buffer TE (Tris - ácido acético-EDTA).

En 1,000 ml disolver:

24.2 g

Tris base.³

5.71 ml

ácido acético glacial (0.2M) (CH₃COOH)⁴

37.2 g

Etilen dinitrilo tetracetato disódico (NaC₁₀H₁₄N₂O₈)⁴

Esterilizar por autoclave

Geles de Agarosa.

Disolver agarosa en buffer TE para obtener una dilución al 1.0% (300mg: 30ml). Calentar en horno de microondas hasta que se disuelva por completo.

Posteriormente, adicionar 1µl de solución de bromuro de etidio, 1 µg por cada 10 ml buffer TE

Solución de acetato de sodio 3M

En 100 ml de H₂O adicionar:

40.8 g

acetato de sodio⁴

Ajustar pH 4.8 con ácido clorhídrico (10 M)

Solución de CTAB / NaCl solución

¹ JT Baker, EUA.

² GIBCO BRL, EUA.

³ Invitrogen, EUA.

⁴ JT Baker EUA.

Disolver 4.1 g NaCl¹ en 80 ml H₂O.

Adicionar 10 g de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)⁵

Mezclar a una temperatura de 65°.

Ajustar volumen final a 100 ml.

Esterilizar por autoclave

Fenol equilibrado

Temporizar el fenol a temperatura ambiente.

Añadir 8-hidroxiquinoleína hasta una concentración final de 0.1% (0.1 g por cada 100 ml).

Añadir un volumen de Tis-HCl 1 M pH 8, agitar constantemente hasta que el fenol alcance cercano a pH 8.

Cuando se haya equilibrado, retirar la fase acuosa (3-4 h) y añadir un volumen de Tis-CHI 0.1 M hasta que el fenol este a un pH 8.

Se conserva protegido de la luz con una capa acuosa de Tis-HCl 0.1M más 0.2% de β-mercaptoetanol, pH 8 a 4° C.

⁵ SIGMA Aldrich, EUA.

APÉNDICE III

Bacteria	Locus	Número de acceso NCBI
<i>A. hydrophila</i>	<i>exe</i>	X66504
<i>B. pseudomallei</i>	<i>gsp</i>	BX571965 y NC 006350*
<i>E. chrysanthemi</i>	<i>out</i>	X65265
<i>E. carotovora</i>	<i>out</i>	BX950851
<i>E. coli</i> K-12	<i>gsp</i>	U00096 y AAC76350*
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>gsp</i>	AY056599
<i>G. sulfurreducens</i>	<i>gsp</i>	AE017180
<i>K. pneumoniae</i>	<i>pul</i>	M32613
<i>L. pneumophila</i>	<i>lsp</i>	AE017354
<i>L. interrogans</i> SV. Copenhageni	<i>gsp</i>	CN005823
<i>L. interrogans</i> SV. Lai	<i>gsp</i>	CN004342
<i>L. biflexa</i> SV. Patoc	<i>gsp</i>	DQ489375 y DQ489376*
<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>gsp</i>	AE004934
<i>Ps. putida</i>	<i>pil</i>	AE015451
<i>E. coli</i> Dysenteriae	<i>gsp</i>	CP000034
<i>V. cholerae</i>	<i>eps</i>	L33796 y 1P9R*
<i>X. campestris</i>	<i>xps</i> y <i>gsp</i>	AE012165 y AE012532*
<i>Y. pestis</i>	<i>gsp</i>	AJ414144

Bacterias donde se han identificado genes del *locus gsp*, con las cuales se realizaron análisis de identidad con genes homólogos en *Leptospira*. Los números de acceso corresponden al GenBank del NCBI, excepto en *V. cholerae* donde el segundo número (*gspE*) de acceso corresponde a Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb). SV = serovariedad, *= primer número de acceso corresponde para *gspD* y el segundo para *gspE*.

APÉNDICE IV

Tabla de resultados de las alineaciones de las secuencias de aminoácidos de la proteína GspD de leptosiras con 14 Bacterias Gram negativas. Datos obtenidos mediante el programa ClustalW.

SeqA	Name	Len (aa)	SeqB	Name	Len (aa)	Score
1	Patoc	595	2	Copenhageni	596	61
1	Patoc	595	3	Hardjo	598	60
1	Patoc	595	4	Lai	615	61
1	Patoc	595	7	Echrysanthemi	709	26
1	Patoc	595	8	Ecoli078H11	616	24
1	Patoc	595	9	Ecolik12	650	26
1	Patoc	595	10	Ecarotovora	650	25
1	Patoc	595	11	Klebsiella	660	25
1	Patoc	595	12	Legionella	790	21
1	Patoc	595	14	Pspputida	591	21
1	Patoc	595	15	Shigella	611	23
2	Copenhageni	596	3	Hardjo	598	91
2	Copenhageni	596	4	Lai	615	100
2	Copenhageni	596	7	Echrysanthemi	709	22
2	Copenhageni	596	8	Ecoli078H11	616	23
2	Copenhageni	596	9	Ecolik12	650	23
2	Copenhageni	596	10	Ecarotovora	650	23
2	Copenhageni	596	11	Klebsiella	660	24
2	Copenhageni	596	12	Legionella	790	22
2	Copenhageni	596	14	Pspputida	591	24
2	Copenhageni	596	15	Shigella	611	24
3	Hardjo	598	4	Lai	615	91
3	Hardjo	598	7	Echrysanthemi	709	21
3	Hardjo	598	8	Ecoli078H11	616	23
3	Hardjo	598	9	Ecolik12	650	22
3	Hardjo	598	10	Ecarotovora	650	23
3	Hardjo	598	11	Klebsiella	660	24
3	Hardjo	598	12	Legionella	790	22
3	Hardjo	598	14	Pspputida	591	24
3	Hardjo	598	15	Shigella	611	24
4	Lai	615	7	Echrysanthemi	709	22
4	Lai	615	8	Ecoli078H11	616	22
4	Lai	615	9	Ecolik12	650	22
4	Lai	615	10	Ecarotovora	650	23
4	Lai	615	11	Klebsiella	660	24
4	Lai	615	12	Legionella	790	21
4	Lai	615	14	Pspputida	591	24
4	Lai	615	15	Shigella	611	23
7	Echrysanthemi	709	8	Ecoli078H11	616	42
7	Echrysanthemi	709	9	Ecolik12	650	51
7	Echrysanthemi	709	10	Ecarotovora	650	73
7	Echrysanthemi	709	11	Klebsiella	660	66
7	Echrysanthemi	709	12	Legionella	790	28
7	Echrysanthemi	709	14	Pspputida	591	31
7	Echrysanthemi	709	15	Shigella	611	42
8	Ecoli078H11	616	9	Ecolik12	650	43
8	Ecoli078H11	616	10	Ecarotovora	650	41
8	Ecoli078H11	616	11	Klebsiella	660	42
8	Ecoli078H11	616	12	Legionella	790	31
8	Ecoli078H11	616	14	Pspputida	591	31
8	Ecoli078H11	616	15	Shigella	611	99
9	Ecolik12	650	10	Ecarotovora	650	51
9	Ecolik12	650	11	Klebsiella	660	52
9	Ecolik12	650	12	Legionella	790	29
9	Ecolik12	650	14	Pspputida	591	29
9	Ecolik12	650	15	Shigella	611	43
10	Ecarotovora	650	11	Klebsiella	660	73
10	Ecarotovora	650	12	Legionella	790	27
10	Ecarotovora	650	14	Pspputida	591	31
10	Ecarotovora	650	15	Shigella	611	41
11	Klebsiella	660	12	Legionella	790	26
11	Klebsiella	660	14	Pspputida	591	31
11	Klebsiella	660	15	Shigella	611	42
12	Legionella	790	14	Pspputida	591	25
12	Legionella	790	15	Shigella	611	31
14	Pspputida	591	15	Shigella	611	30

Shigella = *E. coli* Shigella Dysenteriae.

Tabla de resultados de las alineaciones de las secuencias de aminoácidos de la proteína GspE de leptospiros con 14 Bacterias Gram negativas. Datos obtenidos mediante el programa ClustalW.

SeqA	Name	en (aa)	SeqB	Name	Len (aa)	Score
1	Patoc	558	2	Copenhageni	557	71
1	Patoc	558	3	Hardjobovis	557	72
1	Patoc	558	4	Lai	557	71
1	Patoc	558	5	Ahydrophila	501	42
1	Patoc	558	6	Burkholderia	497	41
1	Patoc	558	7	Ecoli078H11	497	41
1	Patoc	558	8	EcoliK12	493	41
1	Patoc	558	9	Ecarotovora	498	40
1	Patoc	558	10	Echrysanthemi	498	41
1	Patoc	558	11	Klebsiella	497	40
1	Patoc	558	12	Legionella	494	41
1	Patoc	558	13	Psaeruginosa	594	33
1	Patoc	558	14	Psputada	556	30
1	Patoc	558	15	Shigella	497	40
1	Patoc	558	16	Vcholera	418	48
1	Patoc	558	17	Xanthomonas	603	34
1	Patoc	558	18	Yersinia	503	40
2	Copenhageni	557	3	Hardjobovis	557	94
2	Copenhageni	557	4	Lai	557	100
2	Copenhageni	557	5	Ahydrophila	501	41
2	Copenhageni	557	6	Burkholderia	497	42
2	Copenhageni	557	7	Ecoli078H11	497	43
2	Copenhageni	557	8	EcoliK12	493	41
2	Copenhageni	557	9	Ecarotovora	498	43
2	Copenhageni	557	10	Echrysanthemi	498	42
2	Copenhageni	557	11	Klebsiella	497	42
2	Copenhageni	557	12	Legionella	494	41
2	Copenhageni	557	13	Psaeruginosa	594	36
2	Copenhageni	557	14	Psputada	556	32
2	Copenhageni	557	15	Shigella	497	43
2	Copenhageni	557	16	Vcholera	418	49
2	Copenhageni	557	17	Xanthomonas	603	34
2	Copenhageni	557	18	Yersinia	503	41
3	Hardjobovis	557	4	Lai	557	94
3	Hardjobovis	557	5	Ahydrophila	501	41
3	Hardjobovis	557	6	Burkholderia	497	43
3	Hardjobovis	557	7	Ecoli078H11	497	44
3	Hardjobovis	557	8	EcoliK12	493	41
3	Hardjobovis	557	9	Ecarotovora	498	42
3	Hardjobovis	557	10	Echrysanthemi	498	42
3	Hardjobovis	557	11	Klebsiella	497	43
3	Hardjobovis	557	12	Legionella	494	42
3	Hardjobovis	557	13	Psaeruginosa	594	36
3	Hardjobovis	557	14	Psputada	556	31
3	Hardjobovis	557	15	Shigella	497	43
3	Hardjobovis	557	16	Vcholera	418	48
3	Hardjobovis	557	17	Xanthomonas	603	34
3	Hardjobovis	557	18	Yersinia	503	41
4	Lai	557	5	Ahydrophila	501	41
4	Lai	557	6	Burkholderia	497	42
4	Lai	557	7	Ecoli078H11	497	43
4	Lai	557	8	EcoliK12	493	41
4	Lai	557	9	Ecarotovora	498	43
4	Lai	557	10	Echrysanthemi	498	42
4	Lai	557	11	Klebsiella	497	42
4	Lai	557	12	Legionella	494	41
4	Lai	557	13	Psaeruginosa	594	36
4	Lai	557	14	Psputada	556	32
4	Lai	557	15	Shigella	497	43
4	Lai	557	16	Vcholera	418	49
4	Lai	557	17	Xanthomonas	603	34
4	Lai	557	18	Yersinia	503	41

5	Ahydrophila	501	6	Burkholderia	497	50
5	Ahydrophila	501	7	Ecoli078H11	497	64
5	Ahydrophila	501	8	EcoliK12	493	55
5	Ahydrophila	501	9	Ecarotovora	498	66
5	Ahydrophila	501	10	Echrysanthemi	498	67
5	Ahydrophila	501	11	Klebsiella	497	64
5	Ahydrophila	501	12	Legionella	494	55
5	Ahydrophila	501	13	Psaeruginosa	594	36
5	Ahydrophila	501	14	Pspputida	556	35
5	Ahydrophila	501	15	Shigella	497	63
5	Ahydrophila	501	16	Vcholera	418	71
5	Ahydrophila	501	17	Xanthomonas	603	41
5	Ahydrophila	501	18	Yersinia	503	52
6	Burkholderia	497	7	Ecoli078H11	497	50
6	Burkholderia	497	8	EcoliK12	493	46
6	Burkholderia	497	9	Ecarotovora	498	49
6	Burkholderia	497	10	Echrysanthemi	498	52
6	Burkholderia	497	11	Klebsiella	497	51
6	Burkholderia	497	12	Legionella	494	48
6	Burkholderia	497	13	Psaeruginosa	594	37
6	Burkholderia	497	14	Pspputida	556	38
6	Burkholderia	497	15	Shigella	497	49
6	Burkholderia	497	16	Vcholera	418	56
6	Burkholderia	497	17	Xanthomonas	603	42
6	Burkholderia	497	18	Yersinia	503	43
7	Ecoli078H11	497	8	EcoliK12	493	55
7	Ecoli078H11	497	9	Ecarotovora	498	60
7	Ecoli078H11	497	10	Echrysanthemi	498	61
7	Ecoli078H11	497	11	Klebsiella	497	59
7	Ecoli078H11	497	12	Legionella	494	55
7	Ecoli078H11	497	13	Psaeruginosa	594	37
7	Ecoli078H11	497	14	Pspputida	556	39
7	Ecoli078H11	497	15	Shigella	497	97
7	Ecoli078H11	497	16	Vcholera	418	68
7	Ecoli078H11	497	17	Xanthomonas	603	39
7	Ecoli078H11	497	18	Yersinia	503	49
8	EcoliK12	493	9	Ecarotovora	498	57
8	EcoliK12	493	10	Echrysanthemi	498	55
8	EcoliK12	493	11	Klebsiella	497	55
8	EcoliK12	493	12	Legionella	494	49
8	EcoliK12	493	13	Psaeruginosa	594	34
8	EcoliK12	493	14	Pspputida	556	35
8	EcoliK12	493	15	Shigella	497	55
8	EcoliK12	493	16	Vcholera	418	61
8	EcoliK12	493	17	Xanthomonas	603	35
8	EcoliK12	493	18	Yersinia	503	48
9	Ecarotovora	498	10	Echrysanthemi	498	80
9	Ecarotovora	498	11	Klebsiella	497	72
9	Ecarotovora	498	12	Legionella	494	54
9	Ecarotovora	498	13	Psaeruginosa	594	36
9	Ecarotovora	498	14	Pspputida	556	35
9	Ecarotovora	498	15	Shigella	497	60
9	Ecarotovora	498	16	Vcholera	418	64
9	Ecarotovora	498	17	Xanthomonas	603	35
9	Ecarotovora	498	18	Yersinia	503	55
10	Echrysanthemi	498	11	Klebsiella	497	72
10	Echrysanthemi	498	12	Legionella	494	55
10	Echrysanthemi	498	13	Psaeruginosa	594	36
10	Echrysanthemi	498	14	Pspputida	556	38
10	Echrysanthemi	498	15	Shigella	497	60
10	Echrysanthemi	498	16	Vcholera	418	67
10	Echrysanthemi	498	17	Xanthomonas	603	38
10	Echrysanthemi	498	18	Yersinia	503	54

11	Klebsiella	497	12	Legionella	494	53
11	Klebsiella	497	13	Psaeruginosa	594	37
11	Klebsiella	497	14	Pspputida	556	34
11	Klebsiella	497	15	Shigella	497	58
11	Klebsiella	497	16	Vcholera	418	62
11	Klebsiella	497	17	Xanthomonas	603	38
11	Klebsiella	497	18	Yersinia	503	53
12	Legionella	494	13	Psaeruginosa	594	37
12	Legionella	494	14	Pspputida	556	35
12	Legionella	494	15	Shigella	497	54
12	Legionella	494	16	Vcholera	418	60
12	Legionella	494	17	Xanthomonas	603	38
12	Legionella	494	18	Yersinia	503	46
13	Psaeruginosa	594	14	Pspputida	556	57
13	Psaeruginosa	594	15	Shigella	497	36
13	Psaeruginosa	594	16	Vcholera	418	42
13	Psaeruginosa	594	17	Xanthomonas	603	55
13	Psaeruginosa	594	18	Yersinia	503	33
14	Pspputida	556	15	Shigella	497	38
14	Pspputida	556	16	Vcholera	418	39
14	Pspputida	556	17	Xanthomonas	603	51
14	Pspputida	556	18	Yersinia	503	32
15	Shigella	497	16	Vcholera	418	67
15	Shigella	497	17	Xanthomonas	603	38
15	Shigella	497	18	Yersinia	503	50
16	Vcholera	418	17	Xanthomonas	603	42
16	Vcholera	418	18	Yersinia	503	57
17	Xanthomonas	603	18	Yersinia	503	33

=====

Loci gsp