



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL

**“DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA
SECRETINA GSPD_L, DEL SISTEMA DE
SECRECIÓN TIPO 2 (T2SS) DE *Leptospira*,
MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

LUZ ELENA ALCARAZ SOSA

TUTOR:

DR. ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA

COMITÉ TUTORAL:

DRA. ELIZABETH MORALES SALINAS

DR. EDGAR ZENTENO GALINDO

MÉXICO, D. F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A Dios por haberme dado la vida y por brindarme día a día su amor y comprensión.

A mi madre y hermano quienes me dieron todo su apoyo, comprensión y cariño.

A mi familia por todo su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT y PAPIIT IN 222806, por apoyarme económicamente para realizar mis estudios.

A mi tutor: Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma, por su paciencia, apoyo y por darme la oportunidad de realizar este proyecto.

A mi comité tutorial: Dr. Edgar Zenteno Galindo, por todos los consejos y enseñanzas y a la Dra. Elizabeth Morales Salinas, por todas las aportaciones a mi tesis.

Al jurado de mi tesis: Dr. Enrique Aburto Fernández y Dra. Yolanda López Vidal, por todas las aportaciones a mi tesis.

Al Dr. Armandito Rodríguez Reyes, M. en C. Carlos Gerardo Salas Garrido y Dr. Mohamed Alí Pereyra Morales, por toda la super paciencia, apoyo y enseñanzas.

Al Dr. Fernando Costantino Casas, Dra. Laura Romero, Dra. Nuria de Buen Arguero, por todo su apoyo.

A Ma. Alejandra Ayanegui por apoyarme en la estadística.

A Osvaldo y Salomé por los buenos y malos momentos.

A mis compañeros del laboratorio GRILLEP, por su amistad, apoyo y paciencia, ante mi terrible carácter: Ale, Carlos, Lima Limón, Lupita, Liliana, Oli Rachel, Rod, y a mis amigos del laboratorio de Brucelosis: Lucy, Rigoberto, Rosalía, y Yuliett.

A Carlos, Oli, Rachel, Rod y sin ellos no hubiera tenido las muestras de mis hámsteres.

Al Técnico Académico Miguel Ángel Martínez Ramírez (Mr. Michael servidor y amigo), por su apoyo.

Al fotógrafo Jaime Eugenio Córdoba para la toma de fotografías.

Y en general a todas las personas que me apoyaron para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1 Agente etiológico	3
3.2 Sistema de Secreción Tipo 2 (T2SS)	6
3.3 Mecanismos de patogenicidad	9
3.4 Epidemiología	11
3.5 Patogénesis	13
3.6 Signos y lesiones	14
3.7 Inmunidad	18
3.8 Diagnóstico	20
3.9 Antecedentes	22
4. JUSTIFICACIÓN	23
5. HIPÓTESIS	23
6. OBJETIVO GENERAL	24
6.1 Objetivos específicos	24
7. MATERIAL Y MÉTODOS	25
7.1 Expresión de rGspD _L	25
7.2 Preparación de bacterias competentes con cloruro de calcio	25
7.3 Transformación química	26
7.4 PCR de colonias	26
7.5 Inducción de la expresión de rGspD _L	27
7.6 Extracción de rGspD _L	27
7.7 Análisis de proteínas mediante SDS-PAGE	28
7.8 Electro-transferencia	28
7.9 Inmunodetección tipo Western de rGspD _L	29
7.10 Purificación de rGspD _L mediante electroelución	30
7.11 Detección de la proteína electroeluida y concentración	30
7.12 Producción y titulación del suero inmune anti rGspD _L	31

7.13 Infección experimental en hámsteres	31
7.14 Técnica de Inmunocitoquímica	32
7.15 Técnica de Inmunohistoquímica	34
7.16 Análisis estadístico	35
8. RESULTADOS	36
8.1 Detección de la recombinante de pAL208	36
8.2 Expresión de rGspD _L	37
8.3 Purificación de rGspD _L	39
8.4 Titulación del suero inmune anti rGspD _L	40
8.5 Infección experimental en hámsteres	40
8.6 Lesiones macroscópicas	41
8.7 Lesiones microscópicas	44
8.8 Aislamiento y observación en campo oscuro	48
8.9 Técnica de Inmunocitoquímica	48
8.10 Técnica de Inmunohistoquímica	50
8.11 Comparación de resultados de las tres pruebas diagnósticas	52
9. DISCUSIÓN	55
10. CONCLUSIONES	65
11. BIBLIOGRAFÍA	66
12. APÉNDICE 1	78
13. APÉNDICE 2 (SOLUCIONES Y MEDIOS)	81

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Relación entre serovariedad y especie animal	12
Cuadro 2 Presentaciones clínicas y patológicas	18
Cuadro 3 Calendario de inoculación de rGspD _L	31
Cuadro 4 Lesiones macroscópicas, microscópicas e inmunohistoquímica	44
Cuadro 5 Análisis estadístico	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Antígenos de superficie de <i>Leptospira</i>	9
Figura 2 Producto de PCR de colonias	36
Figura 3 Gel de poliacrilamida-SDS teñido con Coomassie	37
Figura 4 Inmunodetección tipo Western de rGspD _L	38
Figura 5 Inmunodetección tipo Western de la elución de rGspD _L	39
Figura 6 Titulación del suero inmune anti rGspD _L	40
Figura 7 Lesiones macroscópicas	42
Figura 8 Distribución de lesiones macroscópicas	43
Figura 9 Lesiones microscópicas	46
Figura 10 Distribución de lesiones microscópicas	47
Figura 11 Inmunocitoquímica	49
Figura 12 Inmunohistoquímica	51
Figura 13 Proporción de resultados totales	54

1. RESUMEN

La leptospirosis es una de las zoonosis con mayor distribución en el mundo. El diagnóstico se realiza a través de la detección de anticuerpos y con la detección de leptospiras, sus antígenos o ácidos nucleicos en tejidos y líquidos corporales de los pacientes. Las proteínas de superficie como la secretina GspD_L del Sistema de Secreción Tipo 2 (T2SS) pueden servir como blanco para la respuesta inmune durante la infección y por lo tanto para el desarrollo de pruebas diagnósticas basadas en su detección. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un ensayo de inmunohistoquímica para la detección de leptospiras así como para comprobar que GspD_L, era expresada durante la infección. Para la expresión de GspD se utilizó el plásmido recombinante pAL208, conteniendo el gen *gspD* de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo Hardjobovis L550 (pET28a-*gspD*). El análisis de las proteínas totales se realizó en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 12% y para la detección de GspD_L recombinante por inmunotransferencia tipo Western se utilizó un anticuerpo monoclonal dirigido contra el péptido T7 codificado en el vector de expresión. La proteína recombinante se purificó por electro-elución y se preparó un anticuerpo policlonal de conejo anti-rGspD_L para la detección de leptospiras *in situ* por inmunohistoquímica. Se infectaron por vía intraperitoneal 20 hámsteres con un aislado virulento de *L. interrogans* serovariedad Canicola. Los resultados revelaron la presencia de *Leptospira* en los tejidos hepático y renal, lo cual confirma por un lado la infección y por el otro la expresión de GspD_L durante la infección en hámsteres, estos hallazgos fueron además comprobados mediante el aislamiento del microorganismo en medios de cultivo a partir de los mismos órganos.

Palabras clave: *Leptospira*, T2SS, GspD, Inmunohistoquímica

2. ABSTRACT

Leptospirosis is considered the most widespread zoonosis in the world. In general, diagnosis is done either by laboratory techniques which detect antibodies against leptospiral antigens, or techniques such as PCR, immunofluorescence or immunohistochemistry that can detect either specific DNA sequences or surface antigens, respectively. Outer membrane proteins such as GspD_L the Type 2 Secretion System (T2SS) secretin are expressed during infection and might be good targets for the immune response as well as good antigens that could be used for diagnostic purposes. The aim of this work was to detect whether GspD_L is expressed during infection by means of an immunohistochemistry assay. Hamsters (n=20), were inoculated IP with virulent *Leptospira* cultures (*L. interrogans*, serovar Canicola), previously isolated from dogs. The expression of GspD_L was done in *E. coli* harboring the recombinant pAL208 plasmid, containing the *L. borgpetersenii* serovar Hardjo *gspD* gene (pET28a-*gspD*). Total proteins analysis was made in 12% polyacrilamide gels, followed by detection of the recombinant GspD_L (rGspD_L), with an anti-T7 peptide monoclonal antibody in Western blot assays. The rGspD_L was purified by electro elution and finally, was used to produce a rabbit polyclonal anti-rGspD_L immune serum. *In situ* detection of leptospires in kidneys and livers of infected hamsters was made with the polyclonal anti-rGspD_L rabbit antibody by immunohistochemistry using the complex streptoavidine-biotin-peroxidase. The results confirmed that GspD is expressed in hamsters during infection with *L. interrogans* serovar Canicola.

Key words: *Leptospira*, T2SS, GspD, Immunohistochemistry

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa de distribución mundial, afecta tanto a los animales silvestres y domésticos así como al hombre. Las principales fuentes de contagio son la orina, tejidos y líquidos fetales de los animales enfermos, portadores asintomáticos y reservorios. La infección por *Leptospira* se asocia a los períodos de lluvia y se presenta tanto en áreas urbanas como rurales de países desarrollados y subdesarrollados (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001; Bharti *et al.*, 2003). La leptospirosis en rumiantes y cerdos se asocia con abortos, infertilidad, agalactia y nacimiento de crías débiles y en el caso de perros con daño hepático y renal. El diagnóstico se realiza a través de técnicas que detectan anticuerpos contra las leptospiras o por la detección de leptospiras, o sus antígenos o sus ácidos nucleicos en los tejidos o líquidos corporales (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001). Después de la infección aguda, el microorganismo persiste en diferentes órganos, tales como; la cámara anterior del ojo, las meninges, el útero y notoriamente, en el riñón (Faine *et al.*, 1999). Se propuso que la habilidad de las leptospiras para sobrevivir fuera del huésped, se refleja en la expresión diferencial de las proteínas que se encuentran en su membrana externa y su adaptación al medio y que la expresión de las proteínas durante la infección podría entonces considerarse como un blanco para la respuesta inmune, por lo que la identificación de antígenos expresados durante la infección tendría además, aplicación para el desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas (Barnett *et al.*, 1999).

3.1 Agente etiológico.

Las leptospiras son espiroquetas, de 5 a 20 μm de longitud y 0.1 a 0.2 μm de diámetro. Son bacterias flexibles, helicoidales, con los extremos en forma de gancho y dos flagelos periplásmicos que les permite su movilidad característica (Levett, 2001; Picardeau *et al.*, 2001). El genoma de *Leptospira* consta de 2 cromosomas circulares (Ren *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 2004). El genoma es más grande que el de otras espiroquetas como *Treponema* y *Borrelia*, lo cual pudiera asociarse con la habilidad de *Leptospira* para sobrevivir dentro de diversos ambientes: huésped animal y libremente en el medio (Bharti *et al.*, 2003). *Leptospira* es un género bacteriano que agrupa espiroquetas con una cubierta de organización estructural que corresponde a bacterias Gram negativas y que taxonómicamente pertenece al orden *Spirochaetales* y a la familia *Leptospiraceae*. La clasificación de *Leptospira* está basada tanto en las diferencias y similitudes a nivel genético, como en su fenotipo antigénico (Faine *et al.*, 1999). Estudios de hibridación de ácidos nucleicos han mostrado que, el género *Leptospira* incluye a 11 especies patógenas: *L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, (Institut Pasteur UBM, 2006), *L. licerasiae* (Levett *et al.*, 2007 a y b), *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilli* y *L. wolfii* (Levett *et al.*, 2007 a). El género también incluye 4 especies apatógenas que son *L. biflexa*, *L. kmteyi* (Levett *et al.*, 2007 a), *L. meyeri*, y *L. wolbachii*, (Institut Pasteur UBM, 2006), además de 4 especies taxonómicamente reclasificadas en la actualidad, *L. alstonii*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae* y *L. yanagawae* (Levett *et al.*, 2007 a). La gran diversidad antigénica entre leptospiras es por la variabilidad en la estructura y composición del lipopolisacárido (LPS), lo que permite establecer la clasificación del género en serogrupos y serovariedades. Se reconocen 28 serogrupos; más de 260 serovariedades patógenas y más de 60 serovariedades apatógenas (Faine *et al.*, 1999; Bulach *et al.*, 2000; Institut Pasteur UBM, 2006). Existen algunas particularidades entre las clasificaciones genética y antigénica como por ejemplo, serovariedades que incluyen subtipos, como en el caso de Hardjo, con los subtipos Hardjoprajitno y Hardjobovis; los cuales pertenecen a dos diferentes especies: *L. interrogans* y *L. borgpetersenii* respectivamente; siendo

serológicamente indistinguibles entre sí (Farrelly *et al.*, 1987; de la Peña-Moctezuma *et al.*, 1999).

El desarrollo de leptospiras apatógenas se da incluso en temperaturas de 11 a 13°C, pero el desarrollo óptimo *in vitro* de ambas, patógenas y apatógenas, es entre 28 y 30°C; el pH óptimo de desarrollo es ligeramente alcalino (7.2-7.4) y las condiciones aerobias son esenciales para su desarrollo (Faine, 1998; Levett, 2001).

La membrana externa (ME) se ha relacionado con la capacidad de la bacteria para sobrevivir fuera del huésped y su adaptación al medio ambiente (Barnett *et al.*, 1999; Trueba *et al.*, 2004). El LPS es uno de los mayores componentes de la ME, por lo cual contribuye de manera importante a la interacción con el hospedero y es considerado el principal antígeno de *Leptospira* (Levett, 2001; Adler and De la Peña Moctezuma, 2004). Es el blanco primario para la aglutinación y opsonización por anticuerpos del tipo IgM y es fundamental para la clasificación serológica (Bulach, *et al.*, 2000). Anticuerpos anti-LPS proporcionan inmunidad tanto activa como pasiva contra la infección, siendo de corta duración y de serovariedad específica (Levett, 2001).

Otro componente antigénico importante de la superficie de *Leptospira* son las proteínas. Se han descrito tres clases de proteínas de membrana externa (PMEs) en *Leptospira*: lipoproteínas, proteínas transmembranales y proteínas periféricas. La primera proteína transmembranal descrita fue la porina OmpL1 (Haake *et al.*, 1993; Shang *et al.*, 1995). Las más abundantes en su mayoría son lipoproteínas, las cuales se encuentran en la superficie de la ME. Entre éstas, LipL32 (Haake *et al.*, 2000; Guerreiro *et al.*, 2001) y LipL21 (Cullen *et al.*, 2003) son las más abundantes; también se encuentran en la ME LipL48 (Haake and Matsunaga, 2002) y LipL41 (Shang *et al.*, 1995), LipL36 se encuentra en el periplasma (Haake *et al.*, 1998; Barnett *et al.*, 1999). La proteína periférica LipL45 participa en la ruta de secreción de lipoproteínas hacia ambas membranas (Matsunaga *et al.*, 2002). Proteínas con dominios semejantes a inmunoglobulinas (Lig), están localizadas en la superficie de la membrana externa de *Leptospira*, las cuales juegan un papel en la adhesión a las células hospederas (Matsunaga *et al.*, 2003). Dentro de la

membrana externa hay evidencia de la presencia de proteínas del llamado sistema de secreción tipo II (T2SS) (Rodríguez *et al.*, 2005) (Figura 1).

3.2 Sistema de Secreción Tipo 2 (T2SS)

Las bacterias secretan un gran número de proteínas al medio extracelular entre las que se incluyen toxinas, adhesinas y diversas enzimas hidrolíticas las cuales se requieren para la biogénesis de organelos, obtención de nutrientes y expresión de factores de virulencia (Thanassi and Hultgren, 2000).

El sistema de secreción tipo 2 (T2SS), también conocido como vía general de secreción; es responsable de secretar una gran cantidad de enzimas hidrolíticas y toxinas (Cianciotto, 2005). Esta vía de secreción ocurre en dos etapas: primero, la maquinaria Sec, trasloca el sustrato con péptido líder a través de la membrana plasmática y segundo, la proteína pierde el péptido señal y adquiere su conformación nativa en el espacio periplásmico, para posteriormente ser secretada a través de la ME por un complejo sistema multiprotéico, el T2SS (Thanassi and Hultgren, 2000; Lee and Schneewind, 2001; Cianciotto, 2005; Johnson *et al.*, 2006).

Transporte a través de la membrana interna (MI)

En el caso de *E. coli*, el sistema de translocación de la vía Sec está compuesto por tres proteínas denominadas SecY, E y G. La proteína precursora (con el péptido señal), se mantiene en un estado de secreción competente o desplegado gracias a la unión con la proteína chaperona SecB, quien la dirige a la subunidad periférica SecA del complejo de translocación heterotrimérico SecYEG en la membrana citoplasmática (MI) (Driessen, 2001; Lee and Schneewind, 2001). La proteína SecA es una ATPasa cuya actividad de hidrólisis provee de la energía necesaria para la exportación. Por otro lado, un segundo mecanismo involucra una translocación co-traducciona, en donde una proteína naciente con su secuencia señal es reconocida por la partícula de reconocimiento de la señal (SRP) y su receptor. Estas rutas convergen en el sistema de translocación SecYEG que se encuentra asociado con SecA. La selección de la ruta se determina inmediatamente después de que la secuencia señal naciente emerge del ribosoma

(Driessen, 2001). Una vez que los polipéptidos se translocan del citoplasma hacia el espacio periplásmico, actúa una peptidasa que procesa el péptido líder, para finalmente liberar a la proteína madura en el espacio periplásmico (Driessen, 2001).

En la ruta regulada por la chaperona SecB, ésta reconoce al dominio nascente de la preproteína. El complejo binario se dirige a SecYEG unido a SecA, o bien, primero se asocia con SecA en el citosol a través de una interacción de baja afinidad, hasta que los sitios de translocación en la membrana estén disponibles (Driessen, 2001). Para interactuar con la translocasa se requiere de la unión de alta afinidad entre SecB y SecA, lo cual es seguido de la unión de la secuencia señal a SecA, lo que a su vez estabiliza la interacción SecA-SecB (Driessen, 2001). Por último, se transfiere la preproteína de SecB a SecA, se libera SecB de la membrana y se inicia la translocación, proceso que se encuentra acoplado a la unión de ATP por SecA (Driessen, 2001). 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 de la membrana citoplasmática (Driessen, 2001).

Transporte a través de la ME.

El T2SS para el transporte a través de la ME está constituido por entre 12 y 16 proteínas accesorias denominadas Gsp (general secretion pathway) (Pugsley *et al.*, 1997; Thanassi and Hultgren, 2000; Lee and Schneewind, 2001; Sandkvist, 2001). Ya en el periplasma las proteínas sufren modificaciones, tales como la formación de puentes disulfuro o la oligomerización y adquieren su conformación nativa. El T2SS incluye dos componentes en la ME: las proteínas GspD y GspS. La proteína GspD, que pertenece a la familia de las secretinas, se inserta en la ME y por medio de su oligomerización, se forma un anillo dodecamérico con un diámetro interno de entre 76 y 95 Å, suficiente para el transporte de polipéptidos plegados (Pugsley *et al.*, 1997). La secretina GspD está conservada entre los diferentes T2SS y también es un homólogo de componentes del proceso de polimerización del pili tipo IV, que es una estructura filamentosa de adhesión presente en algunas bacterias patógenas como *E. coli*, *P. aeruginosa*,

Neisseria gonorrhoeae, entre otras y que también participa en la movilidad independiente de flagelo que se da sobre superficies sólidas (Cianciotto, 2005). Por su parte, GspS es una lipoproteína de la ME que actúa como chaperona de GspD para su correcto plegamiento y actividad (Driessen, 2001). Sin embargo, la mayoría de las proteínas que conforman este sistema (GspB C, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O) se localizan en la MI o bien en el periplasma asociadas a la MI, mientras que la ATPasa GspE, que energiza el proceso, se localiza en la región citosólica e interactúa con el componente GspL de la MI (Sandkvist, 2001).

Cinco de los componentes del T2SS (GspG, H, I, J, K) son similares a las subunidades estructurales del pili tipo IV, por lo que se han denominado pseudopilinas (Lee and Schneewind, 2001; Sandkvist, 2001). Estos componentes se exportan con una secuencia señal de prepilina que es procesada por GspO. Se ha propuesto que estas proteínas se ensamblan en una estructura que a través del periplasma, ayuda de forma directa o indirecta en el proceso de secreción. En este sentido, se ha demostrado que la sobreexpresión de la proteína GspG, genera el ensamblaje de largos pseudopilis (Sauvonnet *et al.*, 2000). Debido a esto, se propuso que GspG en el T2SS podría actuar como un pistón que empujara a las proteínas a secretarse a través de la porina GspD en la ME (Sauvonnet *et al.*, 2000). La ATPasa GspE puede proveer la energía necesaria para la translocación o para el ensamblaje del pseudopili GspG a través de ciclos repetitivos de unión e hidrólisis de ATP. Estas observaciones sugieren que los dos sistemas (T2SS y biogénesis del pili tipo IV) están evolutivamente relacionados (Sandkvist, 2001).

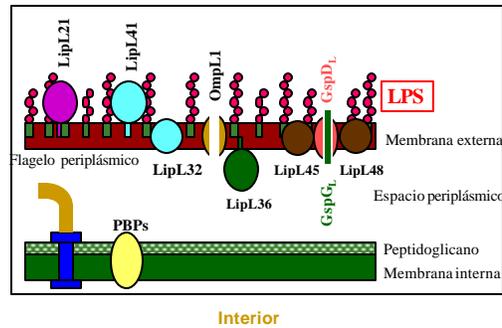


Figura 1. Antígenos de superficie de *Leptospira*

3.3 Mecanismos de patogenicidad

Los mecanismos de patogenicidad de las leptospiras no se conocen con precisión (Adler and De la Peña Moctezuma, 2004).

Leptospira no es considerado un patógeno intracelular, sin embargo se ha demostrado que las leptospiras patógenas tienen la habilidad para invadir células Vero e inducir apoptosis en macrófagos (Merien *et al.*, 1997). En una infección aguda en modelos animales se observaron leptospiras en el intersticio, penetrando entre los hepatocitos y células epiteliales renales sugiriendo una unión a las células hospederas. *In vitro* se observó que leptospiras patógenas se adhieren a células del epitelio renal, así como a fibroblastos, pero no se definió la presencia de adhesinas (Vinh *et al.*, 1984; Ballard *et al.*, 1986; Merien *et al.*, 1998). Se informó la presencia de proteínas localizadas en la superficie de la membrana externa (LigA y LigB) de leptospiras que interactúan con la fibronectina de la célula hospedera, intervienen en la invasión y en la unión a las células hospederas durante la fase inicial de la infección (Lin and Chang, 2007). Están localizadas sólo en bacterias patógenas y no en apatógenas ni en cepas atenuadas (Matsunaga *et al.*, 2003). Se unen a las células epiteliales, endoteliales y neutrófilos donde se tiene acceso al torrente sanguíneo, siendo importantes en la patogénesis de nefritis intersticial (Yang *et al.*, 2000).

Las leptospiras se dispersan rápidamente vía sanguínea hacia los tejidos, las leptospiras apatógenas son fagocitadas por el sistema reticuloendotelial, pero las leptospiras patógenas sobreviven evitando la fagocitosis (Faine, 1998). Las

leptospiras virulentas resisten la acción bactericida de los neutrófilos y el complemento en hospederos no inmunizados, pero las leptospiras son fagocitadas por macrófagos en la presencia de anticuerpos específicos (Adler and De la Peña Moctezuma, 2004). Se demostró *in vitro* que leptospiras patógenas tienen la habilidad para invadir macrófagos en tempranos estados de la infección e inducir su muerte programada (Merien *et al.*, 1997). El LPS de las leptospiras estimula la adherencia de neutrófilos a las células endoteliales y plaquetas provocando agregación, lo cual sugiere el desarrollo de una trombocitopenia (Isogai *et al.*, 1990; Levett, 2001). Las serovariedades Pomona y Copenhageni tienen una actividad citotóxica en el plasma de animales infectados. *In vivo*, éstas toxinas provocan agregación de macrófagos y células polimorfonucleares (Levett, 2001). Se reportó actividad hemolítica en diferentes serovariedades de *Leptospira*, en el caso de Pomona las hemolisinas provocan patologías hemolíticas en el ganado, mientras que en el caso de Ballum, produce lesiones similares en hámsteres (Levett, 2001). En *Leptospira interrogans* serovariedad Hardjo se demostró una hemolisina termolábil (esfingomielinasa C) que degrada la esfingomielina de la célula huésped (Segers *et al.*, 1990). En *L. interrogans* serovariedad Lai se caracterizó otra hemolisina SphH, la cual produce poros en la membrana de eritrocitos de borrego (Lee *et al.*, 2002). Investigando los genes que codifican para hemolisinas, se encontró el gen *hlyX*, el cual puede estar relacionado con leptospiras patógenas. Se observó *in vitro* que HlyX juega un papel muy importante en la actividad hemolítica sobre los eritrocitos, encontrando un sinergismo con LipL32 (Hauk *et al.*, 2005).

Glucolipoproteínas (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^+). Se demostró que las GLP son tóxicas para cultivos de fibroblastos, esto sugiere que la liberación de estos ácidos grasos juega un papel fundamental en la colonización de tejidos (Burth *et al.*, 1997, Yang *et al.*, 2000).

3.4 Epidemiología

La distribución de leptospirosis está determinada por factores geográficos y socioeconómicos, así como de la presencia de reservorios y el medio ambiente que favorecen la sobrevivencia de leptospiras. La infección con *Leptospira* aumenta comúnmente durante los períodos de lluvia, en áreas con pobre drenaje o que sufren inundaciones, suelos alcalinos donde hay una alta densidad de animales portadores y animales susceptibles. La mayor prevalencia de animales seropositivos se relaciona con temperaturas ambientales promedio altas (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001; Bharti *et al.*, 2003).

Poco se sabe acerca de los mecanismos por los cuales leptospiras persisten por periodos largos de tiempo en medios acuosos. *Leptospira* se adapta rápidamente a ambientes viscosos, en los cuales se incrementa su movimiento de traslación, en un estudio se observó que cuando leptospiras patógenas eran cultivadas en agua destilada a un pH de 7.2 permanecían viables por un periodo de 110 días y cuando a esta agua se le agregó 0.5% de agarosa purificada el tiempo de sobrevivencia se triplicó (Trueba *et al.*, 2004). Es por esto que se propuso que la sobrevivencia de leptospiras patógenas fuera del huésped durante periodos largos de tiempo se podía atribuir a la microbiota del ambiente, ya que ésta puede proporcionarle nutrientes, pH adecuado y viscosidad. Esto fue demostrado mediante el aislamiento de bacterias fotosintéticas del medio ambiente, entre ellas *Sphingomonas* y *Flavobacterium*. Cuando estas fueron cultivadas junto con *Leptospira*; se observó que la presencia de *Sphingomonas* favoreció la persistencia de *Leptospira* y por el contrario, *Flavobacterium* ejerció un efecto negativo en su supervivencia (Mejía *et al.*, 2007).

La principal vía de entrada de las leptospiras patógenas es a través de abrasiones en la piel o por mucosas y la principal fuente de infección es el agua contaminada con orina o líquidos fetales y uterinos de animales enfermos, portadores asintomáticos y reservorios naturales (Ashford *et al.*, 2000; Bharti *et al.*, 2003). Los roedores (*Mus musculus*, *Rattus rattus* y otros) son importantes reservorios y la orina de éstos es una de las principales fuentes de contaminación e infección (Faine *et al.*, 1999).

Diferentes serovariedades se asocian con diferentes especies animales (Cuadro 1), encontrándose entonces serovariedades adaptadas a un hospedero y otras serovariedades no adaptadas. Existe cierta relación dentro de las serovariedades adaptadas y un estado de cronicidad o de portador asintomático y por otro lado la presentación de casos graves de enfermedad asociados con las serovariedades no adaptadas (Prescott, 1993; Adler and de la Peña Moctezuma, 2004).

Cuadro 1. Relación entre serovariedades y especie animal de *Leptospira* (Prescott, 1993; Faine *et al.*, 1999; Quinn *et al.*, 2002)

Serovariedades	Especie animal	Relación	
		Portador asintomático o reservorio	Hospedero accidental
Grippotyphosa		X	
Hardjo	Vaca		X
Icterohaemorrhagiae		X	
Pomona			X
Bratislava		X	
Icterohaemorrhagiae		X	
Pomona	Cerdo	X	
Tarassovi			X
Bratislava	Caballo	X	
Pomona			X
Australis		X	
Autumnalis	Ratón	X	
Ballum		X	
Icterohaemorrhagiae	Rata	X	
Canicola		X	
Icterohaemorrhagiae	Perro		X
Pomona			X
Canicola			X
Grippotyphosa	Hámster		X
Pomona			X

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO), consideran a la leptospirosis como una enfermedad de gran importancia debido a sus repercusiones en la salud de humanos y animales así como en la economía de los países (Colin, 1997). Entre las pérdidas económicas ocasionadas por la enfermedad se pueden mencionar aquellas debidas a abortos, nacimiento de animales débiles, mortinatos,

infertilidad, agalactia transitoria; además del aspecto social que conlleva la enfermedad en seres humanos relacionada con su ocupación profesional (Colin 1997). En el caso de humanos, la leptospirosis se considera como una enfermedad accidental y ocupacional, asociada con actividades tales como práctica veterinaria, trabajadores del sector agropecuario, pescadores, trabajadores de rastros y frigoríficos, desolvadores de alcantarillados, propietarios de perros e incluso atletas que practican la natación en lagos y lagunas contaminadas (Bharti *et al.*, 2003).

En estudios realizados en trabajadores del sistema intermunicipal de los servicios de agua potable y alcantarillado en Guadalajara, México se encontró una seroprevalencia de 36.1%, por grupo de edad y la serovariedad predominante fue Canicola en el 53.8% de los casos (Colin, 1997). El Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE), realizó estudios serológicos a 22,024 personas de 1997 a 2007 donde se reportó una frecuencia del 66%. Entre estas, 2,558 personas fueron positivas serológicamente y se observó mayor frecuencia en personas de los 20 a 49 años de edad. El género más afectado fue el masculino (51%). Asimismo, se observó que el 58% de la población presentó anticuerpos contra más de una serovariedad¹.

3.5 Patogénesis

La principal fuente de infección natural directa es a través del contacto con la orina contaminada con leptospiras o indirectamente por agua contaminada. Las leptospiras penetran al organismo a través de las mucosas o piel dañada; un número muy pequeño de leptospiras (1-10) pueden causar infección fatal en animales susceptibles (Faine, 1998). Se difunden invadiendo el torrente sanguíneo y multiplicándose en éste en ausencia de anticuerpos; la leptospiremia se mantiene de 4 a 10 días después de la infección inicial (Bernard, 1993; Baranton and Old, 1995; Barocchi *et al.*, 2002; León-Lara, 2005). La leptospiremia persiste permitiendo la diseminación del microorganismo a los tejidos, produciendo una gama diferente de signologías, dependiendo de la especie animal y del tejido

¹ INDRE. García Suárez Rosario, comunicación personal

afectado, que van desde fiebre, abortos, infertilidad, agalactia, nacimiento de crías débiles y posteriormente, daños hepático y renal. La acción leptospiricida de las inmunoglobulinas del suero y la acción del complemento, aproximadamente a los 10 días de la infección, eliminan las leptospiras del torrente sanguíneo. Sin embargo, el microorganismo se localiza y persiste en diferentes órganos, en particular sitios inmunoprivilegiados, tales como la cámara anterior del ojo, las meninges, el útero y notoriamente los túbulos contorneados del riñón, donde los anticuerpos tienen poco acceso (Prescott, 1993; Faine *et al.*, 1999).

Las leptospiras patógenas alcanzan el riñón a través de la vía hematógena, migran a través del endotelio vascular y persisten en el espacio intersticial para finalmente migrar y multiplicarse en la luz de los túbulos renales. Las leptospiras son entonces eliminadas por la orina (leptospiruria) que puede tener carácter continuo o intermitente y de duración variada, incluso de por vida (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001; Yang *et al.*, 2001).

3.6 Signos y lesiones

La leptospirosis produce diversas manifestaciones desde la infección subclínica, hasta la producción de cuadros clínicos graves caracterizados por fiebre, ictericia, daño renal y hepático (Sitprija *et al.*, 1980). La lesión primaria en todas las formas de leptospirosis es el daño al endotelio vascular (Faine, 1998) causado por hemolisinas, provocando daños isquémicos y muerte celular (Hauk *et al.*, 2005).

Los signos clínicos que aparecen en la leptospirosis son muy variados y las lesiones no son patognomónicas, por lo que no puede basarse en ellos para el diagnóstico de la enfermedad (Cuadro 2) (Quinn *et al.*, 2002).

La mayoría de las infecciones por *Leptospira* son subclínicas particularmente en animales y son detectadas sólo por la presencia de anticuerpos o por lesiones menores en el riñón (Prescott, 1993).

En la fase aguda se ven afectados particularmente los animales jóvenes. En los casos clínicos, los signos observables son; anorexia, fiebre, arqueamiento, por dolor lumbar (renal), ictericia, polidipsia, disuria, hematuria, halitosis (Levett, 2001; Adler and De la Peña Moctezuma, 2004).

La ictericia es consecuencia de la anemia hemolítica producida por las hemolisinas y también a causa del daño hepatocelular en especial en las áreas centro-lobulillares, producido por la presencia de leptospiras y por el daño isquémico (Navarro *et al.*, 1981; Prescott, 1993; Cullen and McLachlan, 2001).

Dentro de los signos y lesiones que se pueden observar se encuentra la nefritis intersticial aguda, hemoglobinuria, hepatitis, anemia hemolítica, trombocitopenia, neumonía hemorrágica, meningitis hemorrágica, infertilidad, abortos en el 2º y 3º tercio de la gestación y crías débiles (Radostits *et al.*, 1999; Quinn *et al.*, 2002).

Se ha descrito que la anemia es provocada por hemolisinas y posteriormente por los anticuerpos causando una anemia hemolítica intravascular por la aglutinación de leptospiras con los eritrocitos (Prescott, 1993). La nefritis intersticial está asociada con la presencia de leptospiras en el parénquima renal provocando degeneración tubular, alteraciones vasculares que producen hiperemia, edema y daño endotelial; esta degeneración es debida a la combinación de hipoxia por hipovolemia y pérdida de eritrocitos a causa del LPS y hemolisinas y también debida a la liberación de citocinas por las células inflamatorias infiltradas (Jones, 1997). Se han observado cambios en el filtrado glomerular debido a la presencia de GLP de leptospiras (Burth *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2000). Humanos y animales infectados pueden desarrollar hipocaliemia y oliguria debido a la disminución de la absorción tubular (Yang *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2004).

En la fase sub-aguda los signos y lesiones son similares pero menos severos, ocurriendo en todas las especies (Bolin and Prescott 1999; Radostits *et al.*, 1999).

La leptospirosis crónica se caracteriza por nefritis crónica y uremia, aunque no todos los animales presentan lesiones renales. En animales de mantenimiento y reservorios se observa persistencia de la bacteria y lesiones mínimas. (Faine *et al.*, 1999). Los animales con falla renal presentan anemia no regenerativa, disminución en la filtración glomerular, choque o severa hipovolemia. Hay un incremento vascular de nitrógeno, reducción del pH sanguíneo, conllevando a una acidosis metabólica. Los animales que mueren de falla renal comúnmente presentan cardiotoxicidad debida a una hipercaliemia, acidosis metabólica y edema pulmonar, así como degeneración endotelial y necrosis, resultando en

trombosis por coagulación intravascular diseminada. Otras lesiones observables son úlceras en el tracto digestivo a causa del amoníaco en saliva y jugos gástricos comunes en cuadros urémicos. La regeneración hepática viene después de necrosis extensas, sin embargo cuando el daño es continuo, el tejido es remplazado por tejido conjuntivo fibroso (Cullen and McLachlan, 2001).

En el caso de los perros, se han podido describir 4 síndromes: agudo hemorrágico, crónico urémico (enfermedad de Stuttgart), crónico icterico y reproductivo (Prescott, 1993; Jones, 1997; Quinn *et al.*, 2002).

El síndrome agudo hemorrágico afecta principalmente a cachorros de 3 a 6 meses de edad los cuales pueden presentar septicemia fulminante; la muerte ocurre en pocas horas o en aproximadamente 2 a 3 días, se puede presentar fiebre, deshidratación, hemorragias, hematemesis, melena (Butrón y de la Peña, 1991), epistaxis y petequias. En las mucosas ocasionalmente se observa ictericia, el riñón se observa con hemorragias sub-capsulares y en ocasiones puede haber áreas de hemorragia y necrosis en hígado (Hartman *et al.*, 1986; Prescott, 1993; Jones, 1997).

El síndrome urémico o enfermedad de Stuttgart fue por primera vez descrito en 1898 donde los perros fueron considerados como la segunda fuente principal de infección en el humano (Brod *et al.*, 2005) Este síndrome se caracteriza por presentar, estomatitis ulcerativa, hematemesis, pérdida de peso, deshidratación, coma y muerte (Prescott, 1993; Jones, 1997).

En el síndrome crónico icterico se ven afectados los adultos con lesiones asociadas a la presencia de nefritis crónica y/o hepatitis necrótica. Los animales que sobreviven, quedan como portadores de la bacteria (Quinn *et al.*, 2002).

En forma esporádica, en los perros se presenta un síndrome abortivo en donde se llegan a observar abortos o nacimientos de crías débiles. Generalmente no hay presencia de signos evidentes. Las perras abortan después o durante la fase septicémica. Las lesiones que se observan son edema en la placenta; las crías pueden presentar autólisis o ascitis y peritonitis fibrinosa. En ocasiones se observan lesiones necróticas en riñón e hígado (Cullen and McLachlan, 2001).

La leptospirosis en humanos cursa con dos formas clínicas: anictérica o benigna y la ictérica o grave, también llamada enfermedad de Weil. En la forma anictérica la sintomatología fundamental consiste en fiebre, cefalea, mialgias, artralgias, puede haber daño al sistema nervioso central (SNC) manifestado por síntomas de compromiso meníngeo (meningitis aséptica). En la enfermedad de Weil, los síntomas fundamentales son los relacionados al daño hepato-renal que se manifiesta como ictericia y nefritis con disfunción renal, con probabilidad de que ocurran lesiones pulmonares que se manifiestan como hemorragias que pueden llegar a producir hemoptisis (Márquez *et al.*, 2006). En octubre de 1995 en Nicaragua se presentó un brote de leptospirosis sin ictericia o manifestaciones renales. De la población afectada (2259 personas) el 15% murieron con hemorragias pulmonares. Se logró aislar *Leptospira* de pacientes y reservorios. Esta infección fue producto de la exposición de agua contaminada con orina de animales infectados, particularmente de perros (Trevejo *et al.*, 1998).

Cuadro 2. Presentaciones clínicas y patológicas de leptospirosis en diferentes especies animales.

Hospedero	Lesiones y signos clínicos
Rumiantes	Infertilidad, abortos, agalactia, mortinatos, hemoglobinuria, anemia hemolítica, nacimientos prematuros, crías débiles (Faine, <i>et al.</i> , 1999; Quinn <i>et al.</i> , 2002; Adler and De la Peña Moctezuma, 2004)
Cerdos	Meningitis, hemoglobinuria, daño renal, mastitis, abortos, nacimientos prematuros y momificaciones (Faine <i>et al.</i> , 1999; Quinn <i>et al.</i> , 2002, Moles-Cervantes, 2004)
Perros	Cuatro síndromes: agudo hemorrágico, crónico urémico (enfermedad de Stuttgart), crónico icterico y abortivo (Prescott, 1993; Jones, 1997; Faine <i>et al.</i> , 1999; Quinn <i>et al.</i> , 2002)
Caballos	Abortos, infertilidad, agalactia, hemoglobinuria y uveítis recurrente (forma crónica) (López-Pérez <i>et al.</i> , 1998; Quinn <i>et al.</i> , 2002)
Hámsteres, Cuyes	Pérdida de peso, postración, nefritis intersticial, neumonía hemorrágica, hepatitis (Faine <i>et al.</i> , 1999)

3.7 Inmunidad.

Las serovariedades patógenas tienen una amplia diversidad antigénica atribuida principalmente al lipopolisacárido presente en la membrana externa; en contraste, se observó que antígenos conservados entre serovariedades son principalmente representados por proteínas de membrana externa (PMEs) (Fernández *et al.*, 2007). Teniendo esto en consideración, ciertas proteínas expresadas en cultivos pueden o no ser detectadas durante la infección (Thanassi and Hultgren, 2000; Guerreiro *et al.*, 2001).

La respuesta inmune que se presenta en la infección inicial de leptospirosis es principalmente de tipo humoral. En diferentes fases de la enfermedad, los anticuerpos dirigidos hacia el lipopolisacárido son predominantemente IgM, mientras que los anticuerpos dirigidos hacia las PMEs son principalmente de tipo IgG (Guerreiro *et al.*, 2001).

Tras la infección, se produce elevación de IgM, las cuales dificultan la multiplicación de las leptospiras. Después de algunos días, se producen anticuerpos IgG que producen lisis de las leptospiras circulantes y permanecen en el torrente sanguíneo por aproximadamente 12 meses o varios años después de la infección. El nivel máximo de anticuerpos en los animales infectados se presenta entre la 3ª y 4ª semana de la enfermedad. Posteriormente, declinan estos niveles pero se detectan durante años (Guerreiro *et al.*, 2001).

La inmunidad es específica para las serovariedades y serogrupos de *Leptospira*, la cual se encuentra fuertemente relacionada con antígenos superficiales. El LPS es el antígeno más estudiado en *Leptospira* y es considerado como el principal antígeno protector (Vinh *et al.*, 1986; Faine *et al.*, 1999). Anticuerpos monoclonales dirigidos contra el LPS, son opsonizantes, inducen fagocitosis, aglutinan leptospiras y protegen pasivamente hámsteres contra el desafío (Faine, 1999).

Sonrier *et al.*, (2001) realizaron investigaciones sobre la protección que ejercía la utilización de 3 bacterinas de varios serogrupos; una de ellas fueron preparaciones de bacterias muertas, otra fue de extractos de LPS y por último extractos de proteínas, encontrando que el uso de extractos totales indujo completa protección contra desafíos homólogos y parcial protección contra desafíos heterólogos; la

utilización de fracciones de LPS indujo protección homóloga y la utilización del extracto de proteínas ejerció protección heteróloga.

Las PME's son el sitio más factible de interacción de *Leptospira* con el huésped y el sistema inmune (Adler and De la Peña Moctezuma, 2004). Algunas proteínas recombinantes de membrana externa proporcionan inmunidad parcial en animales de laboratorio; debido a esto, se han realizado ensayos de inmunidad con dichas PME's. Uno de los estudios más relevantes fue la combinación de la porina OmpL1 y la lipoproteína LipL41 en ensayos de inmunidad. La combinación de estas proteínas ofreció sinergismo inmunogénico resultando en una protección parcial en hámsteres (Haake *et al.*, 1999).

Por otro lado se demostró la expresión de LipL32 *in vivo* observando que es una lipoproteína conservada entre especies patógenas de *Leptospira* y ausente en serovariedades apatógenas. LipL32 fue identificada como el antígeno proteico inmunodominante con el que se tuvo una mejor utilidad serodiagnóstica mediante inmunohistoquímica (Haake *et al.*, 2000). Cullen *et al.*, (2003) demostraron por otro lado que la lipoproteína LipL21 es la segunda más abundante PME en leptospirosas patógenas y que es igualmente expresada durante la infección.

Se demostró mediante inmunohistoquímica sobre tejidos renales que LigA se expresó sólo *in vivo* en comparación con cultivos *in vitro* donde no se detectó por inmunotransferencia, lo que sugiere que LigA sólo se expresa durante la infección (Palaniappan *et al.*, 2002). Se demostró que la inmunización con proteínas recombinantes Lig (LigA y LigB) confieren inmunidad parcial en hámsteres (Medeiros *et al.*, 2007).

Esto sugiere que las PME's, las cuales son altamente conservadas entre leptospirosas patógenas, son potenciales inmunógenos contra leptospirosis (Haake *et al.*, 2002).

3.8 Diagnóstico

Debido a la inespecificidad de los cuadros clínicos, la amplia distribución del microorganismo en el medio, su lento desarrollo *in vitro* y la subjetividad de los métodos serológicos, el diagnóstico de la leptospirosis es difícil. Las técnicas

utilizadas se basan en la detección de los anticuerpos contra leptospiras patógenas y técnicas que detectan leptospiras o sus antígenos o sus ácidos nucleicos en tejidos y líquidos corporales de los pacientes sospechosos (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001).

La serología es el método más utilizado para el diagnóstico de leptospirosis, detecta anticuerpos principalmente del tipo IgM en suero, los cuales alcanzan títulos detectables de los 7 a los 10 días de iniciada la infección. Sin embargo, la amplia distribución de *Leptospira* en la naturaleza, debida a la presencia de animales reservorios naturales como roedores, tanto en el medio rural como el urbano, hace común la posibilidad del contacto a lo largo de la vida de un individuo. Por esta razón, no es rara la detección de anticuerpos aglutinantes con títulos bajos, considerados inespecíficos en individuos sanos o con signología igualmente inespecífica. Es por esto que para establecer el diagnóstico de una infección activa se requiere de la detección de un incremento en 4 veces el título inicial de anticuerpos en una segunda muestra de suero colectada 14 días posteriores a la primera toma (Levett, 2001; Bharti *et al.*, 2003), lo cual resulta con frecuencia impráctico.

La prueba diagnóstica definitiva es el aislamiento del agente, siendo en el caso de *Leptospira* muy lento (semanas a meses y dependiente de la fragilidad de ésta espiroqueta). Durante la fase leptospirémica se pueden aislar microorganismos de sangre y órganos, tales como hígado y riñón. Después de la segunda semana, a consecuencia del aumento en el título de anticuerpos circulantes, leptospiras patógenas desaparecen del torrente circulatorio por lo cual no es posible su aislamiento de sangre pero sí de órganos y de orina (fase de leptospiuria) (Levett, 2001, Adler and De la Peña-Moctezuma, 2004).

Otro método diagnóstico es a través de la detección del ADN, mediante técnicas de hibridación o mediante PCR (Bharti *et al.*, 2003). Asimismo, se demostró la presencia del microorganismo en tejidos y orina a través de técnicas inmunológicas como la inmunohistoquímica (Haake *et al.*, 2000).

Con estudios de inmunohistoquímica se encontró que las lipoproteínas LipL32 y LipL41 son expresadas dentro del túbulo contorneado proximal mientras que la

expresión de LipL36 no fue detectada durante la infección (Barnett *et al.*, 1999; Haake *et al.*, 2000).

Wild *et al.*, (2002) comparó la inmunoreactividad de 3 anticuerpos en tejidos renales de perros infectados con *Leptospira*. Uno de los anticuerpos estuvo dirigido contra LPS y los otros dos contra las PMEs, OmpL1 y LipL41. Se observaron resultados favorables con el anticuerpo dirigido al LPS, en cuanto a la reacción con los anticuerpos dirigidos hacia las proteínas, se observó una reacción menor y sólo en las áreas lumbales.

3.9 Antecedentes

Mena (2006), identificó y secuenció el gen *gspD* de *Leptospira biflexa* serovariedad Patoc Patoc I que codifica para la secretina del T2SS observando una similitud de 46% con sus homólogos en leptospiros patógenas.

Se reportó la presencia de 8 nuevas supuestas PMEs a partir de extractos de ME de *L. interrogans* sv Lai analizados mediante geles de doble dimensión y espectrografía tipo MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionization time of flight) (Cullen *et al.*, 2001). Una de esas nuevas proteínas fue denominada pL18. El análisis del genoma de *L. borgpetersenii* sv Hardjo, Hardjobovis L550 por De la Peña Moctezuma² reveló a pL18 como un homólogo de la pseudopilina GspG, un componente del T2SS en Gram negativas. Análisis bioinformático del genoma de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo Hardjobovis L550 reveló la presencia del T2SS consistente de 14 marcos abiertos de lectura (MALs). Dentro de tres MALs corriente arriba de *gspG* (pL18), se encuentra el gen codificante de GspD, la secretina del T2SS.

Recientemente Rodríguez (2007 a), clonó y expresó en *E. coli* el gen codificante de GspD_L de *L. borgpetersenii* sv Hardjo (Hardjobovis L550) y evaluó su antigenicidad mediante inmunotransferencia tipo Western, donde demostró que efectivamente GspD_L es una proteína antigénica en humanos, bovinos, caninos y hámsteres.

² Comunicación personal

Análisis de la secuencia de aminoácidos de GspD_L de *Hadjobovis* L550 reveló un 96% de similitud (92 % de identidad) con GspD de las *svs* Lai y Copenhageni (Rodríguez, 2007 a).

El hecho de que GspD sea la única proteína del T2SS que en diferentes bacterias Gram negativas se ubica en la superficie de la membrana externa y que su integridad es fundamental para el óptimo funcionamiento de esta ruta de secreción bacteriana, sugiere su potencial utilidad como inmunógeno.

4. JUSTIFICACIÓN

Las proteínas localizadas en la superficie bacteriana durante la infección son antigénicas y pueden constituir un blanco para la respuesta inmune. Tal es el caso de la secretina GspD del T2SS de *Leptospira* la cual es antigénica y es potencialmente un importante elemento para el metabolismo y patogénesis, así como para el desarrollo de metodologías diagnósticas alternativas y de inmunógenos recombinantes contra la leptospirosis.

5. HIPÓTESIS

La secretina GspD del T2SS de *Leptospira*, es expresada durante la infección y puede ser detectada en muestras de riñón e hígado mediante inmunohistoquímica.

6. OBJETIVO GENERAL

Confirmar la expresión *in vivo* de la secretina GspD de *Leptospira* en tejidos de animales infectados experimentalmente mediante inmunohistoquímica (IHQ).

6.1 Objetivos específicos

6.1.1 Estandarizar una prueba de inmunohistoquímica (IHQ) contra la secretina GspD de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo.

6.1.2 Estandarizar una prueba de IHQ para diagnóstico de leptospirosis, utilizando anticuerpos contra antígenos totales de un aislado virulento de *L. interrogans*.

6.1.3 Detectar leptospiras a partir de tejido renal y hepático de hámsteres infectados experimentalmente mediante inmunohistoquímica.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Expresión de la proteína rGspD_L

Para la expresión de la proteína recombinante GspD_L (rGspD_L) se utilizó el plásmido recombinante pAL208, en el cual se clonó el gen *gspD_L* de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo Hardjobovis L550 (pET28a-gspD_L) (Rodríguez *et al*, 2005).

La expresión se realizó en *E. coli* Rosetta DE3 (Novagene) codon plus competentes conteniendo a pAL208 por transformación química, inducidas con 5mM de isopropil-β-tiogalactósido (IPTG) durante 16 h (Ausubel *et al.*, 1996).

7.2 Preparación de bacterias competentes con cloruro de calcio

Para la preparación de cultivos competentes de *E. coli* aptos para la transformación, se siguió el protocolo propuesto por Sambrook, (2001).

Se inocularon 50 ml de medio líquido Luria Bertani (LB) (Apéndice 2) con 50 µg/ml de kanamicina (LB Ka) con 3 colonias de *E. coli* Rosetta codon plus. El cultivo se incubó a 37°C con agitación orbital (Agitador Orbital Dual, Lab-line) a 200 rpm durante 16 h. Posteriormente el cultivo se diluyó 1:50 en medio LB Ka (50 µg/ml) (10 ml del cultivo de 16 h + 490 ml de medio líquido LB). Este nuevo cultivo se incubó a 37°C con agitación orbital a 200 rpm durante 2 h y al término de la incubación, el matraz se colocó en hielo. El cultivo se centrifugó (Jouan MR1812) a 3,500 x g durante 10 min a 4° C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla de bacterias se resuspendió en 100 ml de una solución de CaCl₂ 50 mM (Apéndice 2). El cultivo se mantuvo en hielo durante 6 h y al término de esta incubación en frío las bacterias se centrifugaron a 3,500 x g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se eliminó y la pastilla de bacterias se resuspendió nuevamente en 100 ml de CaCl₂ 50 mM. Este paso se repitió dos veces más. Finalmente, la pastilla de bacterias se resuspendió en un décimo del volumen (10 ml) de una solución estéril de CaCl₂ 50mM, 20% de glicerol. Se prepararon alícuotas con 100 µl de bacterias competentes por tubo y se congelaron rápidamente

introduciéndolas en un tanque de nitrógeno líquido, durante 10 a 15 seg. Finalmente, las alícuotas se almacenaron a -80° C hasta su uso.

7.3 Transformación química.

Para la transformación de células competentes con el plásmido recombinante pAL208 se siguió el protocolo propuesto por Ausubel, (1996).

Una alícuota de *E. coli* Rosetta codon plus competentes se colocó en hielo, una vez descongeladas, se le adicionaron 4 µl de una solución del plásmido recombinante pAL208 (1µg/µl), la mezcla se mantuvo en hielo durante 10 min. A continuación, se dio un choque de calor de 2 min a 42°C en un baño María (Isotherm Waterbath Mod. 2LS-M, Fisher Scientific). Inmediatamente después, se inoculó la mezcla en 1 ml de medio SOC (Apéndice 2) y la mezcla se incubó a 37°C con agitación orbital a 200 rpm durante 1 h. Al término de la incubación se realizó el plaqueo de las bacterias transformantes (50, 100 y 200 µl) en agar LB (LB Ka 50 µg/ml) y cloramfenicol (LB Cl 34 µg /ml). El inóculo se expandió en toda la superficie del agar con una varilla de vidrio en “L” y las cajas se incubaron (Incubadora Bluem Budget) a 37°C durante 24 h. Después de la incubación, las colonias transformadas se seleccionaron y sembraron por duplicado en cajas de agar LB Ka, Cl.

7.4 PCR de colonias

Para la detección de colonias recombinantes, se realizaron ensayos de PCR de colonia, utilizando como iniciadores BAP1230 (5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG G 3') y BAP1231 (5' GCT AGT TAT TGC TCA GCG G 3') ubicados en el promotor y terminador T7 para el vector pET, respectivamente. Se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: Buffer 10X-2.5 µl; MgCl (Roche) 25 mM-4µl; d'NTPs (Invitrogene) 10 mM-1µl; BAP1230-1µl; BAP1231-1µl; TAQ POL (Promega) 2U y H₂O en un volumen suficiente para una reacción final de 25 µl. Una colonia se colectó con una punta plástica de la pipeta y mezclada con la reacción para PCR. El termociclador (Perkin Elmer Mod. 2400) se programó para las siguientes condiciones de reacción: 1 ciclo de 94 °C / 5 min seguido de 38 ciclos de 94 °C /

30 seg, 56 °C / 50 seg y 72 °C/ 1:30 y finalmente, 1 ciclo de 72 °C/ 7 min. 5µl de la reacción se depositaron en un gel de agarosa al 1% y se sometieron a electroforesis en un amortiguador (TAE) (Apéndice 2), teñidos con bromuro de etidio a 5µg/ml (Sigma). Después de la electroforesis, el gel se observó en un procesador de imágenes (Fluor S Multiimager, Bio-Rad) y la imagen se resguardó electrónicamente.

7.5 Inducción de la expresión de rGspD_L

Se seleccionó una de las colonias donde se obtuvo amplificación por PCR del fragmento clonado, para ser cultivada en 50 ml de caldo LB Ka, Cl. Se incubó a 37°C con agitación orbital a 200 rpm durante 16 h. Posteriormente, el cultivo se diluyó con una relación 1:50 en medio LB Ka, Cl (10 ml del cultivo de 16 h + 490 ml de medio líquido LB) y se incubó a 37°C con agitación orbital a 200 rpm durante 2 h. Una vez alcanzada una absorbancia (UV Visible Spectrophotometer Pharmacia Biotech Ultrospec Mod. 3000) de 0.636 D.O.₆₀₀ se inició la inducción de la expresión utilizando IPTG 5 mM, el cultivo se mantuvo en agitación orbital a 200 rpm a temperatura ambiente (TA) durante 3 y 16 h.

7.6 Extracción de rGspD_L

Al término de la inducción con IPTG, la cepa recombinante se centrifugó a 3,500 x g por 5 min a 4 °C, el sobrenadante se eliminó y la pastilla de bacterias se resuspendió en 5ml de PBS pH 7.2 (Apéndice 2). Las bacterias resuspendidas se mantuvieron en hielo y sonicadas (Sonicador Cole Parmer, Mod. CPX600) bajo las siguientes constantes: Pulsos de 9 seg y descanso de 50 seg y amplitud 60%. Se repitieron de 2 a 3 ciclos de sonicación hasta que la solución clarificó. En todo momento, las muestras procesadas se mantuvieron en hielo y al final del proceso los sonicados se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

7.7 Análisis de proteínas mediante SDS-PAGE

El análisis de las proteínas totales sonicadas de la recombinante *E. coli* Rosetta pAL208 se realizó mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) (Apéndice 2), según protocolo de Laemmli, (1970) con algunas modificaciones (Rodríguez, 2007 a). Se preparó un gel de poliacrilamida-SDS al 12% (gel separador), con un grosor de 0.75 mm. En la parte superior se preparó un gel al 4% (gel concentrador) con el mismo grosor. Los geles se colocaron en una cámara de electroforesis (Cámara de Electroforesis Vertical Bio-Rad, Mod. Mini-PROTEAN II Cell). Las proteínas totales se mezclaron con amortiguador de muestra en una relación 1:1 (Apéndice 2). Posteriormente, se mantuvieron en ebullición durante 5 min, las muestras se colocaron en los pozos correspondientes a razón de 15 µl por pozo. Se utilizaron 7 µl del marcador de peso molecular comercial (Mark 12[®], Invitrogen) para la comparación de los pesos moleculares de las diferentes proteínas de las muestras. Las electroforesis (Electrophoresis Power Supply EPS 600) se realizaron a 50V en el gel concentrador y 100V en el gel separador en un amortiguador (Apéndice 2). Una vez que finalizó la electroforesis, el gel se tiñó con azul brillante de Coomassie (Apéndice 2) durante toda la noche en agitación constante. Después, se retiró la solución y se agregó solución desteñidora (Apéndice 2), realizando varios cambios hasta que las bandas fueron visualizadas. Se desechó la solución y se lavó el gel varias veces con agua destilada, hasta fijarlo en papel celofán dulce para su deshidratación.

7.8 Electro-Transferencia

Una membrana de nitrocelulosa del tamaño del gel y el mismo gel de poliacrilamida se sumergieron durante 30 min en amortiguador de Towbin frío (Apéndice 2). Las esponjas del equipo de electrotransferencia y el papel filtro también se humedecieron en el mismo amortiguador antes de ensamblar todos los componentes. El ensamblaje del estuche se realizó en un recipiente de plástico conteniendo el amortiguador Towbin frío (Apéndice 2) de la siguiente forma: En contacto con la tapa negra se colocó una esponja, encima de ésta se colocó una hoja de papel filtro previamente humedecido, luego se colocó el gel y sobre éste

se colocó la membrana de nitrocelulosa; otra hoja de papel filtro humedecida se colocó encima de la membrana y por último se colocó la otra esponja, cerrando el estuche perfectamente para ser colocado dentro de la cámara de electrotransferencia. La transferencia se realizó durante 1:30 h a 100V. Posteriormente, se realizó la inmunodetección tipo Western.

7.9 Inmunodetección tipo Western de rGspD_L

Para la detección de la proteína se utilizó un anticuerpo monoclonal dirigido contra el péptido T7 (anticuerpo monoclonal anti-T7-HRP (Novagene®) codificada en el vector de expresión pET28a. La membrana se bloqueó mediante una incubación de 30 min en agitación orbital a 15 rpm a TA en una solución de TBS-T (Apéndice 2) y 5% de leche descremada. Posteriormente, la membrana se incubó durante 16 h en agitación orbital a 15 rpm a TA, con el anticuerpo monoclonal anti-T7-HRP, diluido 1:5,000 en TBS-T. Entonces, la membrana se lavó 4 veces en TBS-T con 5% de leche descremada durante 5 min cada lavado y 4 lavados con TBS (Apéndice 2) de 5 min cada uno. Todos los lavados se realizaron en agitación orbital a 15 rpm. Finalmente la membrana se colocó en una solución de revelado (Apéndice 2) y se mantuvo en agitación orbital a 15 rpm a TA, por 15 min, protegida de la luz, hasta observar la reacción. La reacción se detuvo mediante un enjuague final en agua destilada, la membrana se secó en papel filtro y las imágenes de las reacciones de inmunodetección se registraron en fotografía digital (Cámara Carl-Zeiss Sony DSC-S60).

7.10 Purificación de rGspD_L mediante electroelución

Después de la expresión de rGspD_L, se procedió a su purificación mediante electro-elución (Bio-Rad Electro-eluter Mod. 422) a partir de los geles de poliacrilamida revelados en una solución fría de KCl 250 mM.

Una vez seleccionada y finamente fragmentada la banda conteniendo la proteína de interés, se depositó en un tubo de vidrio del sistema de electro-elución, el cual

posee en su porción final un adaptador con una membrana de diálisis para retención de proteínas mayores de 30 kDa. El proceso de elusión se realizó a 8 mA por tubo durante 16 h, al final del proceso se retiraron los tubos de la cámara y el adaptador se separó de cada tubo con la membrana unida a él para recuperar la proteína electroeluída en un volumen aproximado de 500 μ l/tubo. La proteína en suspensión se almacenó a -20°C hasta su uso.

7.11 Detección de la proteína electroeluída y concentración

Una vez concluida una fase de 10 procesos de electro-elusión, se procedió a realizar los ensayos de SDS-PAGE e inmunodetección de rGspD_L purificada. La inmunodetección se realizó utilizando el anticuerpo monoclonal anti-T7-HRP diluido 1:5,000 siguiendo el protocolo anteriormente descrito.

Para su posterior manejo en los ensayos de producción de anticuerpos, la proteína eluída se concentró mediante filtración diferencial en filtros (Electrophoresis Power Supply EPS 600Millipore[®]) con punto de corte de 30 kDa hasta obtener una concentración aproximada de 0.5 μ g/ μ l. Las preparaciones electroeluídas se depositaron en los tubos del sistema de filtración y se centrifugaron a 3,500 x g durante 30 min a 4°C hasta una reducción aproximada de 1/10 del volumen original.

7.12 Producción y titulación del suero inmune anti rGspD_L

Para la producción del suero inmune contra GspD_L se realizaron modificaciones de la técnica de Cooper *et al.*, (2003). Se utilizó un conejo de raza Nueva Zelanda, de 2.5 kg, clínicamente sano. Se le realizó la prueba de aglutinación microscópica y de inmunotransferencia tipo Western para corroborar la ausencia de anticuerpos aglutinantes anti-*Leptospira*. Para la preparación del inóculo se mezclaron 200 μ l (100 μ g) de la proteína GspD_L concentrada e igualmente de adyuvante incompleto

de Freund (Sigma). La inoculación fue vía intramuscular profunda, realizando 4 inoculaciones, según el esquema que se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Calendario de inoculación de rGspD_L

1 ^a . Inoculación	25 julio 06
2 ^a . Inoculación	05 sept 06
3 ^a . Inoculación	22 sept 06
4 ^a . inoculación	18 oct 06

Posteriormente, se colectó sangre del individuo para realizar la titulación del suero. El suero fue diluido (1/10, 1/00, 1/1,000, 1/2,000, 1/4,000, 1/8,000, 1/16,000 y 1/32,000) y utilizado para la detección de 50µg de rGspD_L mediante inmunotransferencia tipo Western. Una vez obtenido un título representativo se aplicó la eutanasia mediante anestesia disociativa (ketamina 0.25 ml/kg) para desangrar al conejo vía intracardiaca (Cooper *et al.*, 2003). La sangre se depositó en cajas de Petri hasta la formación del coágulo, se separó el suero y éste se centrifugó a 3,500 x g durante 10 min, y se almacenó en diferentes viales en congelación a -20° C.

7.13 Infección experimental en hámsteres

Para la obtención de tejidos infectados, se inocularon de manera experimental 20 hámsteres sirios (*Cricetus aureus*), de 50g, con cultivos virulentos de *L. interrogans* serovariedad Canicola cepas C46 o C59 previamente aislados de riñón de perros asintomático y enfermo respectivamente (Castillo *et al.*, 2006).

Para la primoinfección, se inocularon 0.5 ml de cultivo de leptospiras C46 o C59 en medio Fletcher por vía intraperitoneal conteniendo aproximadamente 10⁶ leptospiras /ml. Los cultivos fueron cuantificados en una cámara de Petroff Hausser (Hausser Scientific). Para infectar experimentalmente al resto de los hámsteres se realizaron macerados de riñón e hígado, obtenidos de los individuos inoculados recién muertos o sacrificados, diluyéndolo en PBS estéril, siguiendo el calendario de inoculación que se muestra en el Apéndice 1.

Para corroborar la presencia de *Leptospira* en los órganos del individuo recién muerto, se observó el macerado a inocular por medio de microscopia de campo oscuro, así como la siembra de una muestra de hígado y de riñón en medio Fletcher (Apéndice 2), para su aislamiento.

Como testigos negativos se sacrificaron 2 hámsteres sin inocular.

De cada hámster se obtuvieron pulmones, un riñón y un lóbulo hepático, los cuales fueron fijados en formaldehído al 10% para posteriormente ser incluidos en parafina. Se realizaron cortes de 3 μm de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE) para observar lesiones histológicas en dichos órganos, así como ensayos de inmunohistoquímica. Las lesiones observadas se registraron en fotografía digital (Microscopio Carl Zeiss Axiostar, programa Canon Zoom Browser EX).

7.14 Técnica de Inmunocitoquímica de cultivos de *Leptospira interrogans* serovariedades Hardjo y Canicola.

Para verificar la reactividad del anticuerpo primario anti GspD_L se utilizó la técnica de inmunocitoquímica (ICQ) aplicándola directamente sobre cultivos de *Leptospira interrogans* serovariedades Hardjo Hardjoprajitno y Canicola utilizando el método de detección Complejo estreptoavidina-Biotina-Peroxidasa (CAB-P) (Histostain®-SP Kits Zymed® LAB-SA Detection System). Se utilizaron laminillas tratadas previamente con Poli-L-Lisina (Sigma Chemical Company) al 3% diluida en acetona. Para realizar el frotis con los cultivos de Hardjo y Canicola se colocó una gota de cultivo en la laminilla tratada y se extendió con el apoyo de otra laminilla, se dejó secar al aire para posteriormente realizar la ICQ. Como testigos positivos se utilizaron suero inmune anti-LipL32 donado por el Dr. David Haake y suero inmune anti-*Leptospira* total cepa C46 (anti-C46) de conejo, previamente obtenido en nuestro laboratorio (Castillo *et al*, 2006).

Para inhibir la peroxidasa endógena, los frotis se trataron con peróxido de hidrógeno (JT Baker) al 30% y metanol absoluto (JT Baker) en una relación de 1:8 durante 15 min a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS pH 7.4 (Apéndice 2) de 5 min cada uno. Para bloquear la adherencia no específica por

parte de los anticuerpos primario y secundario se utilizaron 60 µl de suero de cabra no inmune al 10%, incubando por 60 min en cámara húmeda a 37° C, en este paso no se realizaron lavados, sólo se escurrió el exceso de suero. Se aplicaron entonces 60 µl de anticuerpo primario policlonal anti GspD_L o anti-C46 en diferentes diluciones dobles seriadas, desde 1/25 hasta 1/3,200 diluido en PBS pH 7.4 con 0.5% de leche descremada. Las laminillas se incubaron en la cámara húmeda a 4°C por 16 h. Se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS pH 7.4 y posteriormente se adicionaron 60 µl de anticuerpo secundario biotinilado anti-IgG de conejo (Histostain®-SP Kits Zymed® LAB-SA Detection System) las laminillas se incubaron durante 60 min en cámara húmeda a 37° C. Al finalizar, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS pH 7.4. Posteriormente, se adicionaron 60 µl del conjugado estreptoavidina-peroxidasa (Histostain®-SP Kits Zymed® LAB-SA Detection System) incubando durante 30 min en cámara húmeda a 37° C, y al finalizar se realizaron 3 lavados con agua destilada de 5 min. Para el revelado, primero se adicionó a 1 ml de agua destilada 50µl del cromógeno (aminoetilcarbazol - Histostain®-SP Kits Zymed® LAB-SA Detection System) 50µl de amortiguador y 50µl de peróxido de hidrógeno (Histostain®-SP Kits Zymed® LAB-SA Detection System) al 0.6%; de ésta mezcla se agregaron 60µl a cada lamilla durante 60 seg. Para detener la reacción, las laminillas se enjuagaron con agua destilada y finalmente, se les colocó resina acuosa (Histostain®-SP Kits Zymed® LAB-SA Detection System) y un cubreobjetos.

7.15 Técnica de Inmunohistoquímica

Para la detección de leptospiras en los tejidos de hámsteres inoculados con *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola se realizaron modificaciones de Haines y Chelack, (1991) y Gimeno (2005) con el método de detección Complejo estreptoavidina-Biotina-Peroxidasa (CAB-P). Como testigo positivo de la reacción se utilizó suero anti-C46. Por otro lado, se utilizaron 2 testigos negativos: a) Hígado y riñón de hámster no inoculado adicionando el suero anti-C46 y anti GspD_L y b) hígado y riñón de hámster inoculado, pero sin el anticuerpo primario, el cual se sustituyó con PBS pH 7.4. Se realizaron varios ensayos probando

diluciones dobles desde 1/25 hasta 1/3,200, con los anticuerpos anti C-46 y anti GspD_L. De cada muestra se realizaron 4 cortes seriados de 3-5 μm de grosor utilizando un micrótopo. Se colocaron en laminillas tratadas previamente con Poli-L-Lisina (Sigma Chemical Company) al 3% diluida en acetona. Los cortes se desparafinaron durante 60 min a 60 °C y se realizaron 2 lavados con xilol de 30 min cada uno. Los tejidos se rehidrataron con etanol a diferentes concentraciones (96%, 80%, 70% y 50%) y agua destilada realizando 3 lavados de 5 min cada uno. Para inhibir la peroxidasa endógena, los tejidos fueron tratados con peróxido de hidrógeno (JT Baker) al 30% y metanol absoluto (JT Baker) en una relación de 1:8 durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS pH 7.4 de 5 min cada uno. Para la recuperación antigénica los tejidos se trataron con solución amortiguadora de citratos (Apéndice 2) durante 20 min en horno de microondas. Posterior a ésto se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS pH 7.4. El bloqueo, la exposición a los anticuerpos, la estreptoavidina-peroxidasa, los lavados y el revelado se realizaron como se describió para la ICQ. Para contrastar la coloración obtenida con el cromógeno se utilizó hematoxilina de Harris (Histostain®-SP Kits Zymed® LAB-SA Detection System) durante 5 min. Se enjuagaron con agua de la llave y se pusieron en PBS pH 7.4, durante 1 min. Finalmente, a los tejidos se les colocó resina acuosa y un cubreobjetos.

7.16 Análisis Estadístico.

El análisis descriptivo en algunos casos se presenta como reporte de distribución de frecuencias, en otros casos se presenta con proporciones con intervalos de confianza del 95%, y esta dada por las siguientes formulas:

$$P = \left(\frac{(mp)(100)}{n} \right) \quad e \quad IC = [(P(\%) \pm 1.96) \left[\sqrt{\frac{(P)(100 - P)}{n}} \right]]$$

Donde: P= proporción
 mp= muestras positivas
 n= número de animales muestreados
 IC= intervalo de confianza

Los cálculos se realizaron con los datos presentados en el Apéndice 1, programando las fórmulas en Excel 2000, las figuras se desarrollaron con base en los resultados de frecuencia, proporción e intervalos de confianza. El análisis estadístico para buscar diferencias o similitudes en las proporciones de verdaderos positivos entre las pruebas de: cultivo bacteriano (aislamiento); observación de campo oscuro, inmunohistoquímica para detectar antígenos totales de *L. interrogans* serovariedad Canicola en tejidos fijados de hígado y riñón y la inmunohistoquímica para detectar GspD_L en los mismos órganos, fueron explorados mediante la prueba de Fisher χ^2 ($p \leq 0.05$).

Hipótesis nula: Las proporciones de los resultados entre ambas pruebas diagnósticas son iguales o equivalentes.

Hipótesis alternativa: Las proporciones en los resultados entre ambas pruebas diagnósticas **NO** son iguales o equivalentes.

Se seleccionó La prueba de Fisher ya que al generar las tablas existieron celdas <5. Los análisis se realizaron en los programas NCSS 2000 y PASS 2000 (Jerry Hintze ©2001).

8. RESULTADOS

8.1 Detección de la recombinante de pAL208

Tras haber obtenido la transformación química de la cepa *E. coli* Rosetta con el pAL208 se confirmó su presencia mediante PCR a partir de colonias transformantes desarrolladas en medio LB Ka, CI utilizando los iniciadores BAP 1230 y BAP 1231 (Figura 2).



Figura 2. Productos de PCR de colonias utilizando los iniciadores BAP1230 y BAP1231. Carriles 1 a 7: PCR de colonias transformantes; Carril 10: testigo positivo (*E. coli* Rosetta pAL208, Rodríguez *et al.*, 2007 b); Carril 11: testigo negativo; Carril 12: marcador de peso molecular lambda *Hind* III.

8.2 Expresión de rGspD_L

De las colonias recombinantes se eligió una, para ser cultivada en caldo LB Ka, CI e inducida para la expresión de rGspD_L utilizando isopropil-β-D-tiogalactosido (IPTG) 5 mM. El análisis de las proteínas en geles de poliacrilamida al 12% mostró bandas de proteínas correspondientes a 63 kDa en contraste con los testigos negativos (Figura 3). Para confirmar la presencia de rGspD_L se realizó una inmunodetección tipo Western utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra el péptido T7 (anti-T7-HRP). Como resultado de la inmunodetección se observó la presencia de una banda en las membranas de nitrocelulosa con un peso de 63 kDa correspondiente a rGspD_L (Figura 4).

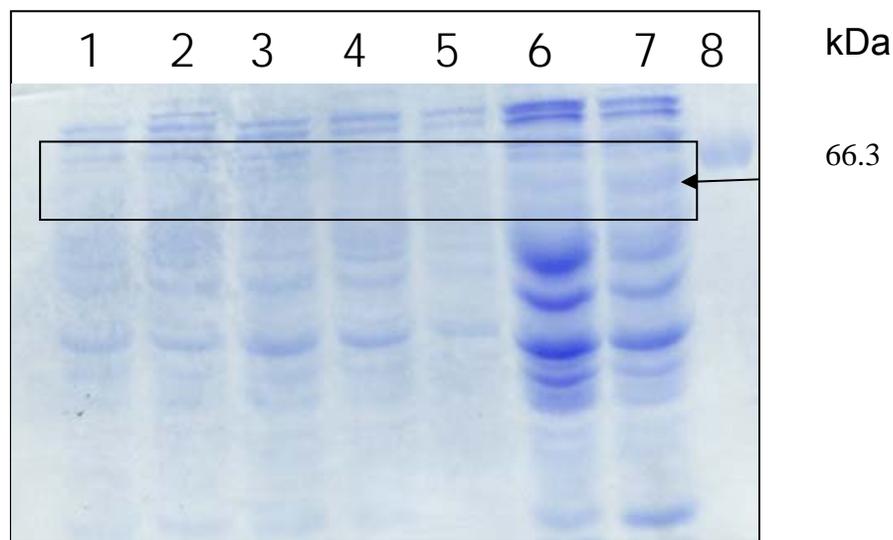


Figura 3. Gel de poliacrilamida-SDS teñido con Azul de Coomassie. Carril 1, 2 y 3: Rosetta s/IPTG, Rosetta c/IPTG y Rosetta pET28a c/IPTG (testigos negativos); Carriles 4 a 7: Rosetta pAL208 s/IPTG 3h, Rosetta pAL208 c/IPTG 3h, Rosetta pAL208 s/IPTG 16 h y Rosetta pAL 208 c/IPTG 16 h. La inducción con IPTG durante 3 h y 16 h muestra las bandas de 63 kDa en los carriles 5 y 7, respectivamente. Carril 8: albúmina sérica bovina con un peso de 66.3 kDa como marcador de peso molecular.

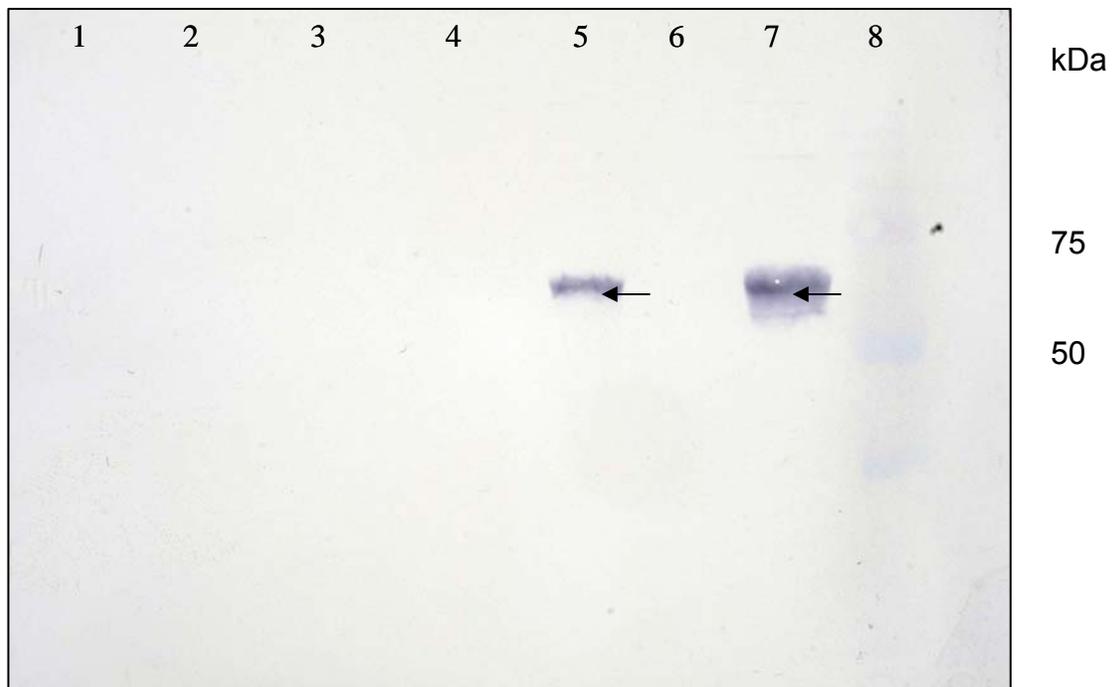


Figura 4. Inmunodetección tipo Western en membranas de nitrocelulosa de la proteína rGspD_L con el anticuerpo monoclonal anti-T7-HRP (Novagene), del gel de poliacrilamida de la Figura 3. Carriles 1, 2 y 3: Rosetta s/IPTG, Rosetta c/IPTG y Rosetta pET28a c/IPTG (testigos negativos); Carriles 4 a 7: Rosetta pAL208 s/IPTG 3h, Rosetta pAL208 c/IPTG 3h, Rosetta pAL208 s/IPTG 16 h y Rosetta pAL 208 c/IPTG 16 h; Carril 8: marcador de peso molecular. Se observa una clara detección de rGspD_L producto de la inducción con IPTG durante 3 h (carril 5) o 16 h (carril 7).

8.3 Purificación de rGspD_L

Con base en los resultados obtenidos, se procedió a la purificación de la proteína recombinante mediante electro-elución. Para corroborar su funcionamiento se realizó la inmunodetección tipo Western de rGspD_L purificada utilizando el anticuerpo monoclonal anti-T7-HRP como se muestra en la Figura 5.

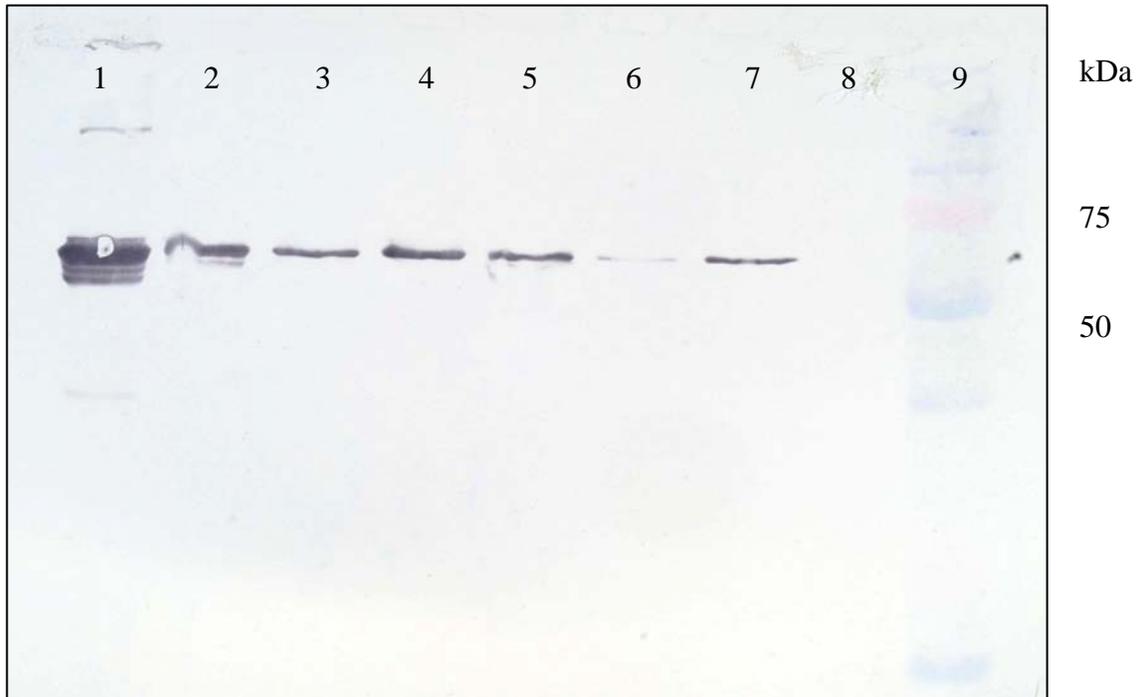


Figura 5. Inmunodetección tipo Western de la elución de rGspD_L con el anticuerpo monoclonal anti-T7-HRP. Carril 1: Rosetta pAL 208 c/IPTG 16 h (testigo positivo); Carriles 2 a 7: productos de electro-elución de rGspD_L; Carril 9: marcador de peso molecular.

8.4 Titulación del suero inmune anti rGspD_L

Se realizó la titulación mediante inmunotransferencia tipo Western, observando títulos hasta 1/32,000 al día 90 post-inoculación (Figura 6).

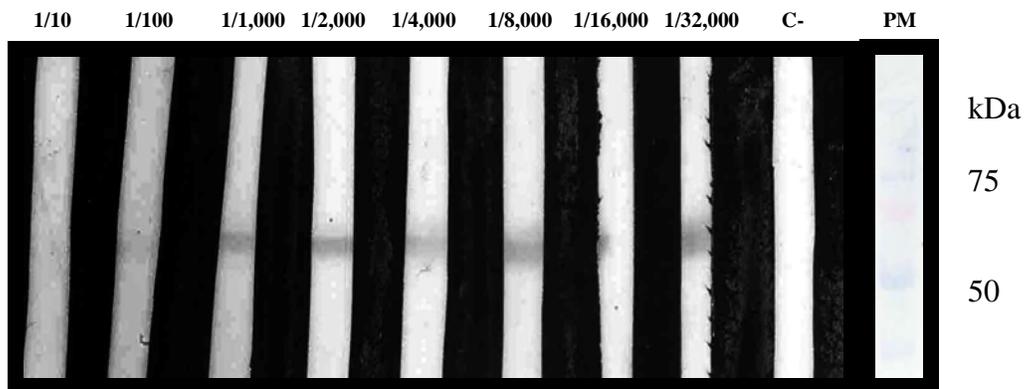


Figura 6. Titulación del suero inmune anti-rGspD_L de conejo en bandas de nitrocelulosa de las inmunotransferencias tipo Western. Se muestra la detección de la proteína desde la dilución 1/100 hasta la dilución 1/32,000. C- suero normal de conejo (día cero).

8.5 Infección experimental en hámsteres

Se inocularon un total de 20 hámsteres sirios (*Cricetus aureus*) por vía intraperitoneal en cinco grupos de cuatro individuos cada uno. La primoinfección se realizó con cultivos de cepas C46 obtenido de riñón de perro asintomático y C59 obtenido de orina de un perro que murió de leptospirosis, mantenidos en medio Fletcher durante aproximadamente 9 meses (Castillo *et al.*, 2006). Se inocularon dos hámsteres con C46 y dos con C59. Posteriormente, se infectaron al resto de los hámsteres con macerados de riñón e hígado, obtenidos de los individuos inoculados recién muertos o sacrificados, diluyéndolo en PBS estéril. La muerte de estos hámsteres ocurrió de los 3 a los 9 días post-inoculación. Los signos de enfermedad se observaron desde el día 2 y consistieron en pelo hirsuto, disminución de actividad y disminución de consumo de alimento y agua.

8.6 Lesiones macroscópicas

Las principales lesiones macroscópicas en los hámsteres inoculados con la cepa C46 fueron: en el parénquima pulmonar se observaron múltiples hemorragias; los riñones presentaron congestión difusa marcada y múltiples hemorragias en la corteza. En el hígado se apreció aumento de tamaño (bordes redondeados) y congestión grave. Los hámsteres inoculados con la cepa C59 presentaron en el parénquima pulmonar múltiples hemorragias; los riñones se mostraron ictericos con escasas petequias y en el hígado se apreció congestión moderada (Figura 7). Estas observaciones fueron consistentes a lo largo de las re-infecciones en cada grupo de dos hámsteres por cepa con la diferencia de que los hámsteres murieron entre los 3 y 4 días post-inoculación cuando se hicieron las inoculaciones directamente de los macerados hepáticos y renales (grupos 1-4) que cuando se utilizaron cultivos conservados durante 9 meses en medio Fletcher (grupo 0) (Apéndice 1). En la Figura 8 y Cuadro 4 se observa la distribución proporcional en la presentación de lesiones congestión y hemorragia, clasificadas por cepas C46 y C59 en pulmón, hígado y riñón, donde las lesiones más graves se presentaron en la cepa C46 (χ^2 p=0.0009).

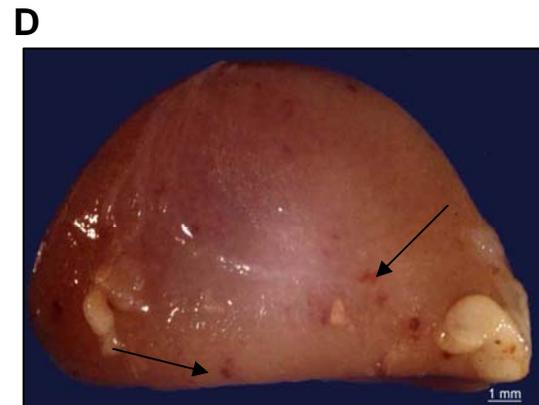
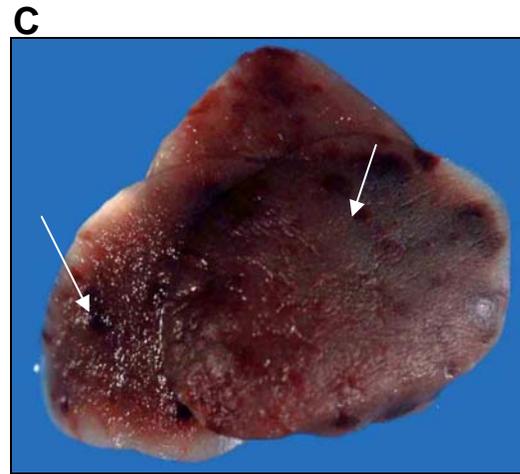
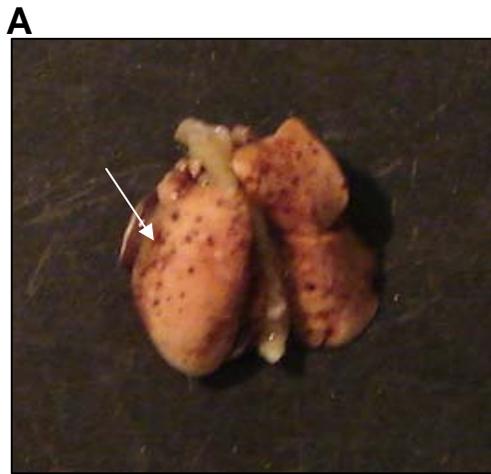


Figura 7. Lesiones macroscópicas en tejidos pulmonar y renal de hámsteres. Paneles **A** y **B**, hámster inoculado con la cepa C46; paneles **C** y **D**, hámster inoculado con la cepa C59. Panel **A**, pulmón con hemorragias multifocales; panel **B**, riñón con múltiples hemorragias en la corteza; panel **C**, pulmón con áreas de hemorragia y panel **D**, riñón icterico con escasas petequias.

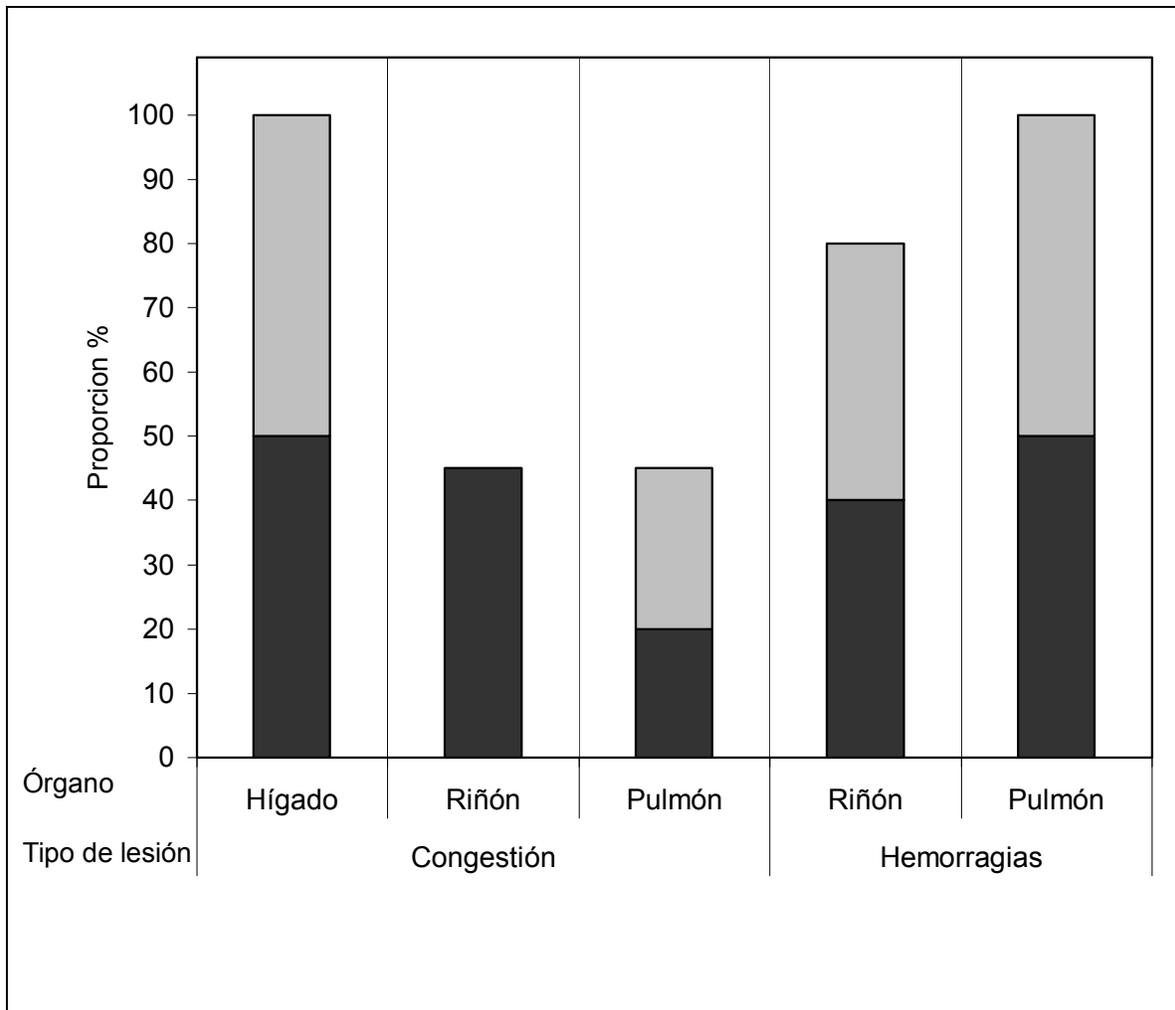


Figura 8. Distribución proporcional en la presentación de lesiones macroscópicas (congestión y hemorragia), producidas por las cepas (C46■ y C59 ■) por órgano (pulmón, hígado y riñón) (n=20).

Cuadro 4. Resultados por individuo de inóculo por cepa utilizada (C46 o C59), días de sobrevivencia y modo de muerte, así como resultados observados en las lesiones macroscópicas y microscópicas totales por órgano (hígado, pulmón y riñón), e IHQ contra antígenos totales de Leptospira y contra GspD en hígado y riñón

C46	Grupo	Días de sobrevivencia	Modo de muerte 0= eutanasia 1= enf	Lesiones macroscópicas*			Total de lx macroscópicas	Lesiones microscópicas			Total de lesiones microscópicas	Total de lx macro y microscópicas	IHQ Anti-C46&	IHQ Anti-GspD&	IHQ Anti-C46&	IHQ Anti-GspD&
				Hígado	Riñón	Pulmón		Hígado**	Riñón***	Pulmón****						
H1	0	9	1	1	2	1	4	4	9	4	17	21	0	0	1	1
H2	0	6	0	1	1	1	3	5	6	6	17	20	1	0	1	1
H5	1	4	1	1	0	1	2	6	9	5	20	22	1	0	1	0
H6	1	4	1	1	2	1	4	3	5	4	12	16	1	0	0	0
H9	2	3	1	1	2	1	4	5	7	4	16	20	1	1	1	1
H10	2	3	1	1	2	1	4	5	5	4	14	18	1	0	0	0
H13	3	4	1	1	2	2	5	6	7	6	19	24	1	1	1	1
H14	3	4	0	1	2	2	5	5	8	5	18	23	1	1	1	1
H17	4	3	0	1	2	2	5	5	9	7	21	26	1	1	1	1
H18	4	3	0	1	2	2	5	4	7	5	16	21	1	0	1	1
Total				10	17	14	41	48	72	50	170	211	9	4	8	7
%				24	42	34		28	43	29						
C59																
H3	0	9	0	1	1	1	3	4	9	5	18	21	1	0	1	0
H4	0	6	0	1	1	1	3	5	5	5	15	18	1	0	1	1
H7	1	4	1	1	1	1	3	2	8	5	15	18	1	0	1	1
H8	1	4	0	1	1	1	3	4	7	5	16	19	1	0	1	1
H11	2	3	0	1	1	1	3	6	7	5	18	21	1	1	1	1
H12	2	3	0	1	1	2	4	5	7	4	16	20	1	1	1	1
H15	3	4	1	1	1	2	4	4	8	6	18	22	1	0	1	0
H16	3	4	0	1	1	2	4	5	7	6	18	22	1	0	1	0
H19	4	3	0	1	0	2	3	3	5	6	14	17	1	1	1	1
H20	4	3	0	1	0	2	3	3	7	6	16	19	1	1	1	1
Total				10	8	15	33	41	70	53	164	197	10	4	10	7
%				30	25	45		25	43	32			100	40	90	70

*Calificación con base en congestión y hemorragias

**Calificación con base en la presencia de congestión, hemorragias, infiltrado de neutrófilos, macrófagos y linfocitos, degeneración y necrosis de hepatocitos

***Calificación con base en la presencia de congestión, hemorragias, trombos, edema, proteína tubular, infiltrado de neutrófilos, linfocitos y macrófagos, degeneración y necrosis tubular.

****Calificación con base en la presencia de congestión, hemorragias, edema intersticial y perivascular, infiltrado de neutrófilos, &1=positivo, 0=negativo

8.7 Lesiones microscópicas

Se realizó el estudio histológico en los riñones, hígados y pulmones de los 20 hámsteres inoculados con las cepas C46 y C59 teñidos con HE.

Las lesiones en pulmón más constantes fueron: áreas de hemorragia intra-alveolar, infiltrado perivascular neutrofílico moderado, necrosis fibrinoide de vasos sanguíneos, agregados de células inflamatorias conformados principalmente por neutrófilos con menor número de linfocitos y macrófagos en capilares y septos alveolares. En riñón se observaron áreas de hemorragia intersticial, degeneración y necrosis de células epiteliales de túbulos contorneados, material eosinofílico hialino intratubular (proteinosis tubular), trombosis, pequeños agregados de neutrófilos en la luz de algunos túbulos (tubulitis neutrofílica), así como discreto infiltrado intersticial conformado por neutrófilos, linfocitos y macrófagos. En hígado se observaron áreas de congestión y hemorragia, abundantes células de Kupper reactivas con eritrocitos en su citoplasma (eritrofagocitosis), múltiples focos de necrosis hepatocelular y necrosis individual de células parenquimatosas, además de agregados de neutrófilos, linfocitos y macrófagos en las zonas de necrosis (Figura 9). A pesar de que las lesiones fueron semejantes en los tejidos de los hámsteres inoculados, se observó una ligera diferencia en la intensidad de las lesiones entre los inoculados con C46 que mostraron lesiones más graves, en comparación con los inoculados con C59 (Apéndice 1 y Cuadro 4). El análisis estadístico no se pudo realizar debido a que el grupo de animales fue muy pequeño. Se analizó la distribución proporcional por órgano y tipo de lesión donde no se observó diferencia entre la presentación de lesiones entre C46 y C59, excepto en la presentación de hemorragia renal, donde la C46 fue proporcionalmente superior a la C59 con una $p=0.05$ (Figura 10).

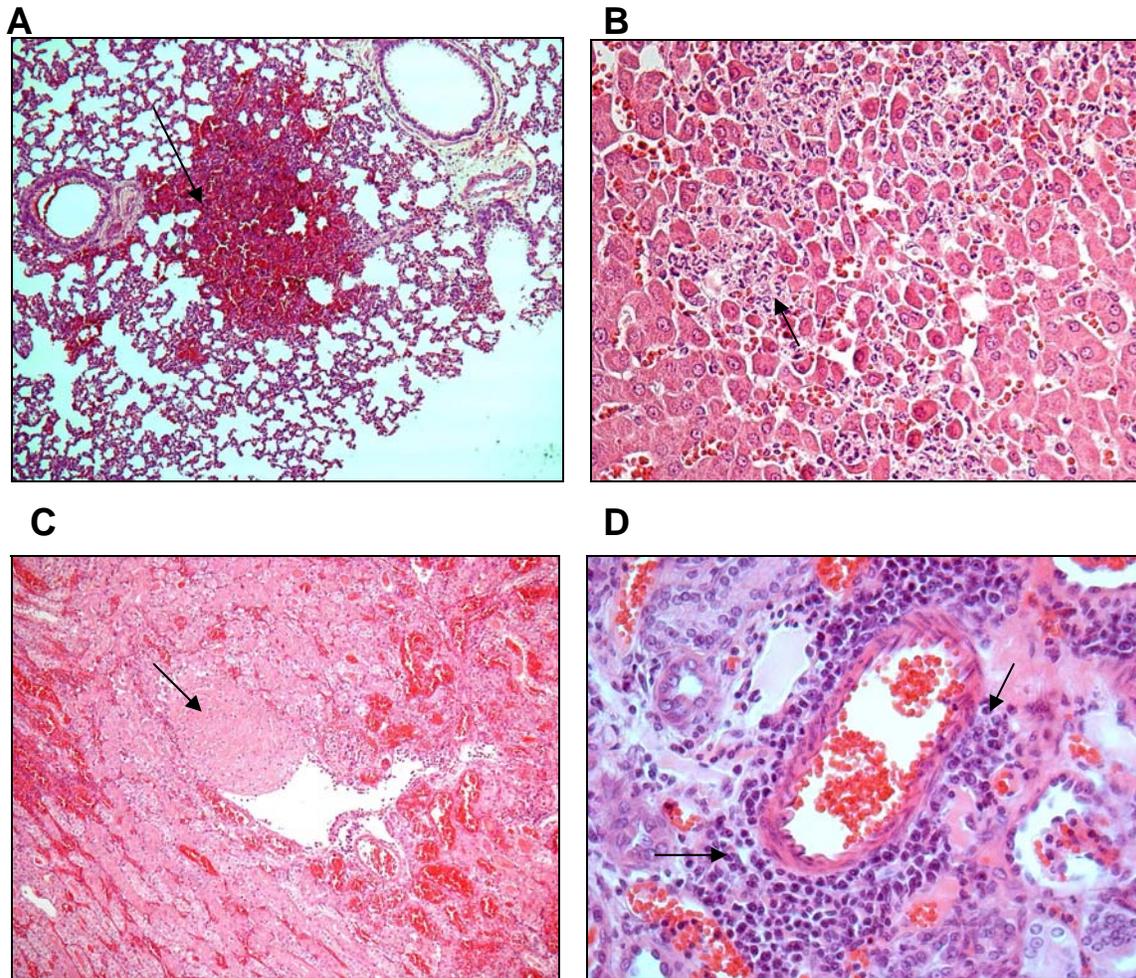


Figura 9. Lesiones microscópicas en tejidos pulmonar hepático y renal de hámsteres inoculados con la cepa C46. Panel **A**, pulmón 100X HE, área de hemorragia (flecha); panel **B**, hígado 100X HE, área con degeneración y necrosis hepatocelular e infiltración inflamatoria; panel **C**, riñón 100X HE, trombo en vaso sanguíneo (flecha); panel **D**, riñón 400X HE, infiltrado inflamatorio perivascular principalmente compuesto por linfocitos y células plasmáticas (flechas).

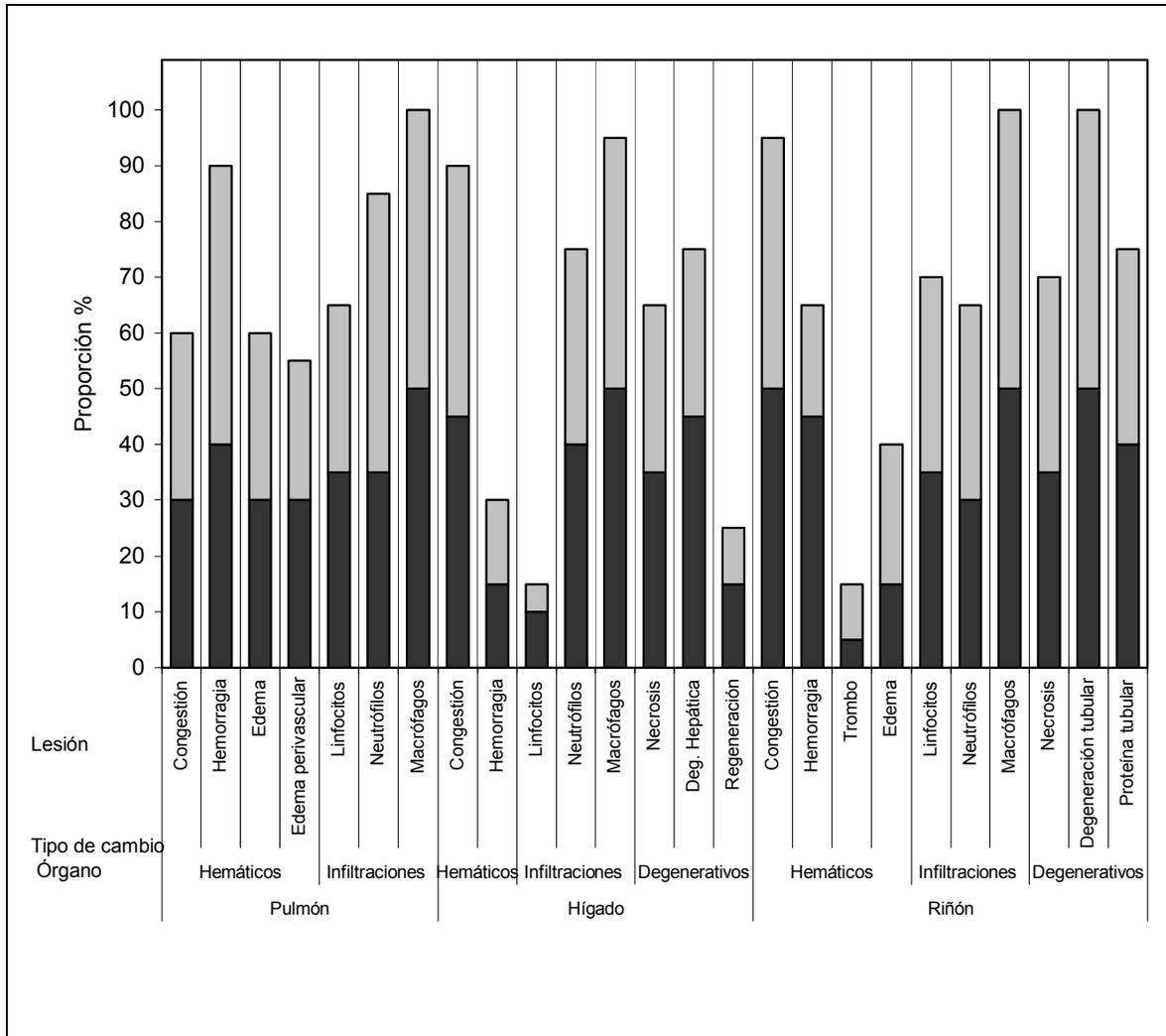


Figura 10. Distribución proporcional de la presentación de lesiones microscópicas por órgano (pulmón, hígado y riñón) y tipo de lesión por cepa (C46 ■ y C59 ▒) (n=20).

8.8 Aislamiento de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola y observación en campo oscuro

De cada macerado que se realizó de riñón e hígado para inocular a los individuos se realizó la observación microscópica en campo oscuro, donde en el 100% de los casos se observaron formas características de leptospiras. Después de la inoculación del macerado de riñón e hígado en medio Fletcher, se logró aislar *Leptospira* en el 100% (n=20) de los animales inoculados, en tanto que los dos animales utilizados como testigo negativo no presentaron desarrollo alguno.

8.9 Técnica de Inmunocitoquímica

Se realizaron varios ensayos utilizando diluciones de los sueros inmunes anti-C46 y anti-GspD_L desde 1/25 hasta 1/3,200 para encontrar la dilución ideal que detectara a las leptospiras observando una respuesta favorable con la dilución 1/200. El resultado obtenido para la detección de leptospiras de las serovariedades Canicola y Hardjoprajitno con los sueros inmunes anti GspD_L y anti-C46 fue favorable, pero se notó mayor afinidad hacia *L. interrogans* serovariedad Hardjoprajitno, observando en un fondo claro leptospiras de color rojo (Figura 11).

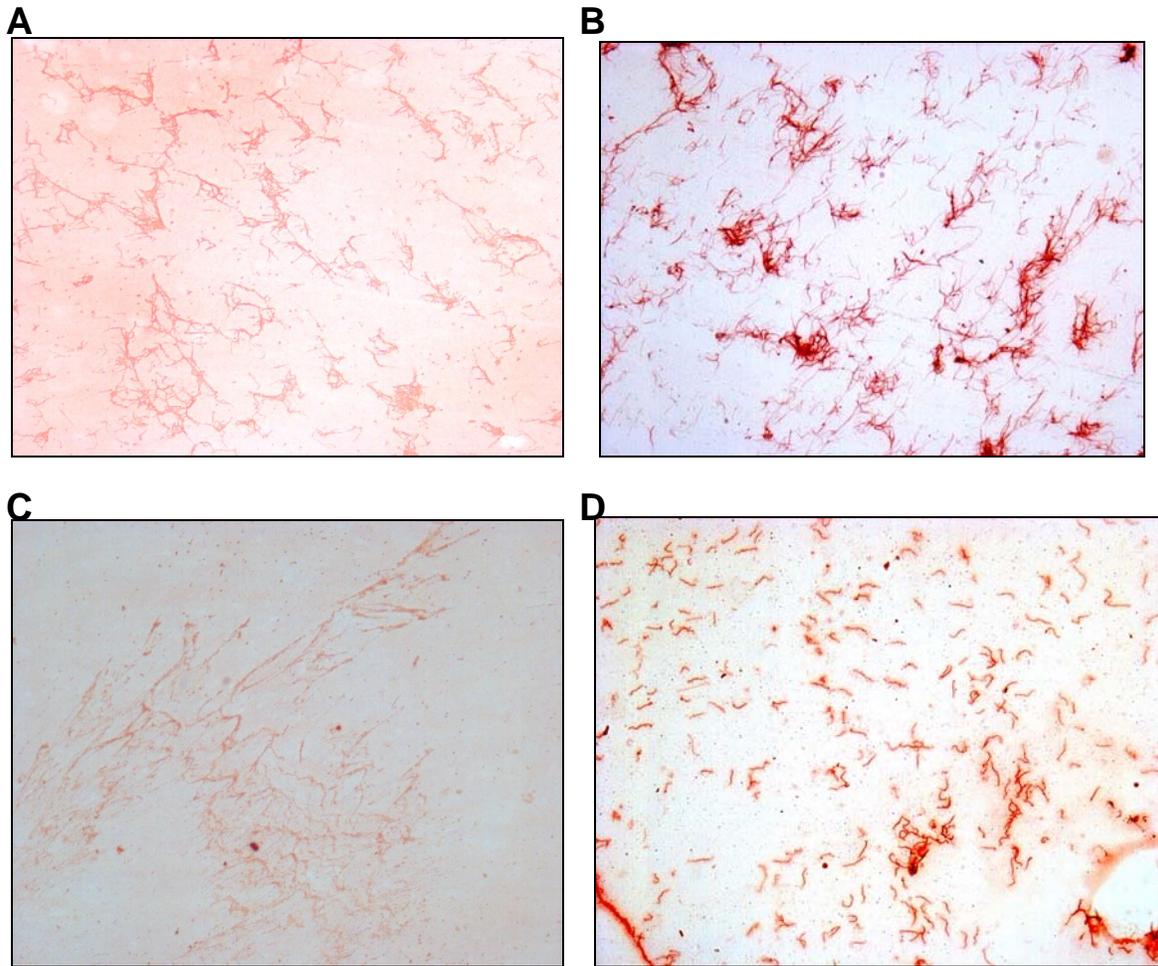


Figura 11. Inmunocitoquímica de *Leptospira interrogans*. 400X. Paneles **A** y **B**, *Leptospira interrogans* sv Hadjo, Hardjoprajitno con sueros inmunes anti-GspD_L de Hardjobovis (Panel A) y anti-C46 (Panel B); paneles **C** y **D**, *Leptospira interrogans* sv Canicola con sueros inmunes anti-GspD_L de Hardjobovis (panel C) y anti-C46, (panel D). Se utilizó una dilución de 1/200 de cada uno de los sueros inmunes. En los diferentes paneles se observan sobre un fondo blanco, leptospiros de color rojo.

8.10 Técnica de Inmunohistoquímica

Para la técnica de inmunohistoquímica se realizaron varios ensayos probando diluciones dobles desde 1/25 hasta 1/3,200, con los anticuerpos anti-C46 y anti-GspD_L. Se observó aparentemente un mejor reconocimiento del antígeno utilizando las diluciones de 1/200 para el anti-C46 y 1/25 para el anti-GspD_L (Figura 12). La inmunohistoquímica contra antígenos totales de *Leptospira* anti-C46 se utilizó como un testigo de calidad para la detección de leptospira presentes en los tejidos, observando positividad en 19 muestras de hígado (95%) y en 18 muestras de riñón (90%). Las espiroquetas fueron detectadas en todos los hámsteres que murieron a los 3, 4, 6 y 9 días (Apéndice 1 y Cuadro 4). Finalmente, la inmunohistoquímica para la detección de la proteína específica GspD_L, fue positiva en 8 muestras de hígado (40%) y en 14 muestras de riñón (70%). GspD_L en hígado solamente fue detectada en los hámsteres que murieron a los 3 y 4 días, en el riñón se detectó en los hámsteres que murieron en los días 3, 4, 6 y 9, aunque no se logró detectar en todos los hámsteres (Apéndice 1 y Cuadro 4).

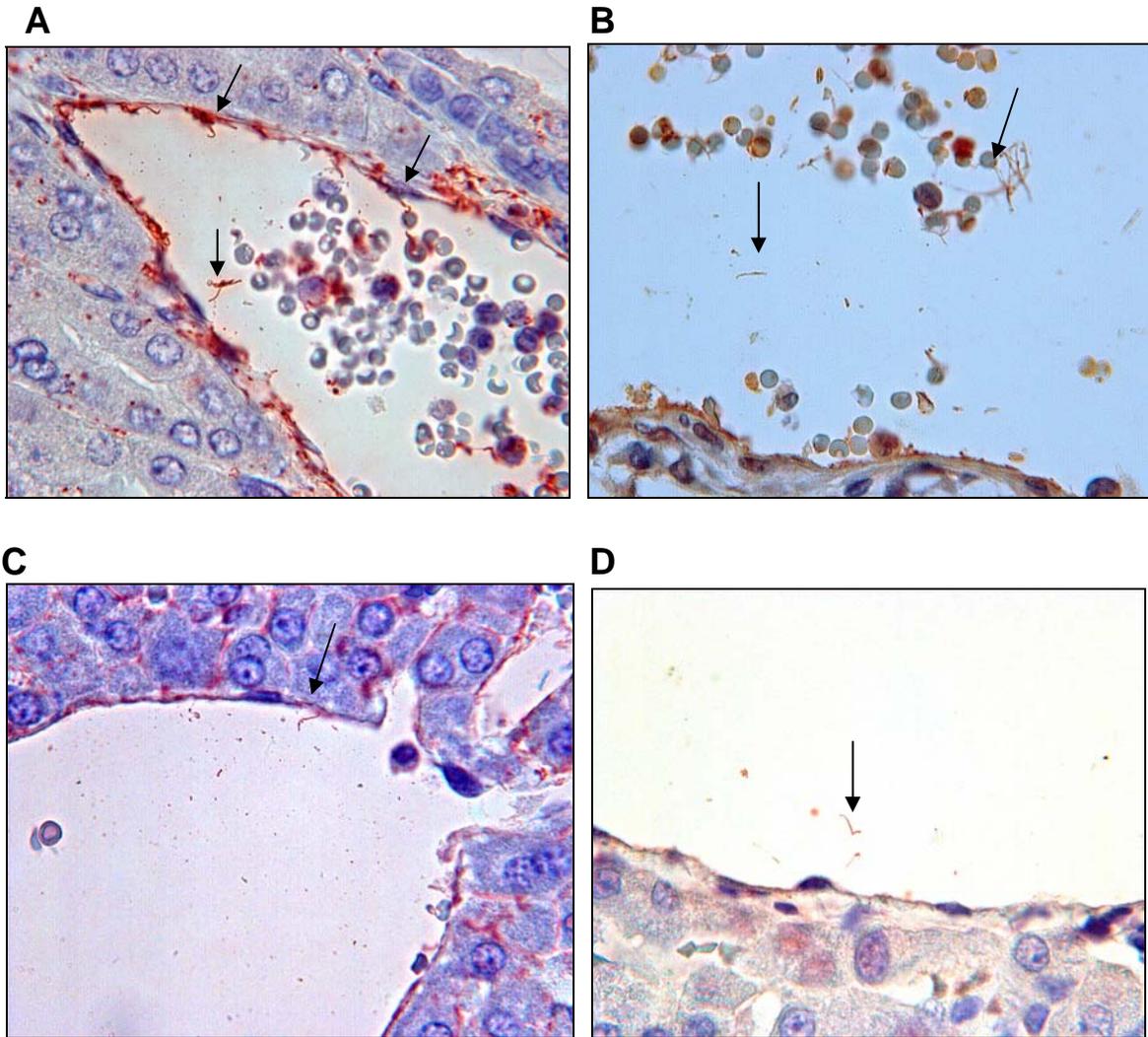


Figura 12. Inmunohistoquímica con el Complejo estreptoavidina-biotina-peroxidasa (1,000X) Paneles **A** y **B**: cortes histológicos de riñón enfrentados a sueros inmunes anti-C46 1/200 (Panel A) y anti-GspD_L de Hardjobovis 1/25 (Panel B); Paneles **C** y **D**; cortes histológicos de hígado enfrentados a sueros inmunes anti-C46 1/200 (Panel C) y anti-GspD_L de Hardjobovis 1/25 (Panel D). Las flechas señalan bacterias del género *Leptospira* de color rojo en el interior y adheridos al endotelio de un vaso sanguíneo.

8.11 Comparación de resultados de las tres pruebas diagnósticas.

La comparación de resultados entre cultivo bacteriano, observación en campo oscuro en tejidos (riñón e hígado), inmunohistoquímica para el reconocimiento de antígenos totales de *L. interrogans* sv Canicola cepa C46 e inmunohistoquímica para el reconocimiento de GspD_L se presentan en la Figura 13 y Apéndice 1.

Se realizó un análisis estadístico (Fisher χ^2 , ($p \leq 0.05$)) para buscar equivalencias o similitudes entre los resultados de las pruebas en los mismos órganos. Se comparó la proporción entre las cuatro pruebas en ambos órganos. Las cuatro técnicas tuvieron la capacidad de detectar al microorganismo, siendo la más eficiente el cultivo ($p \leq 0.05$). No se observó diferencia estadística entre los resultados del cultivo y la inmunohistoquímica para detectar antígenos totales en ambos órganos ($p > 0.05$), mientras que en los resultados del cultivo y la inmunohistoquímica para detectar GspD_L si tuvieron diferencia, así como hubo diferencia entre las dos inmunohistoquímicas ($p = 0.04$) (Cuadro 5).

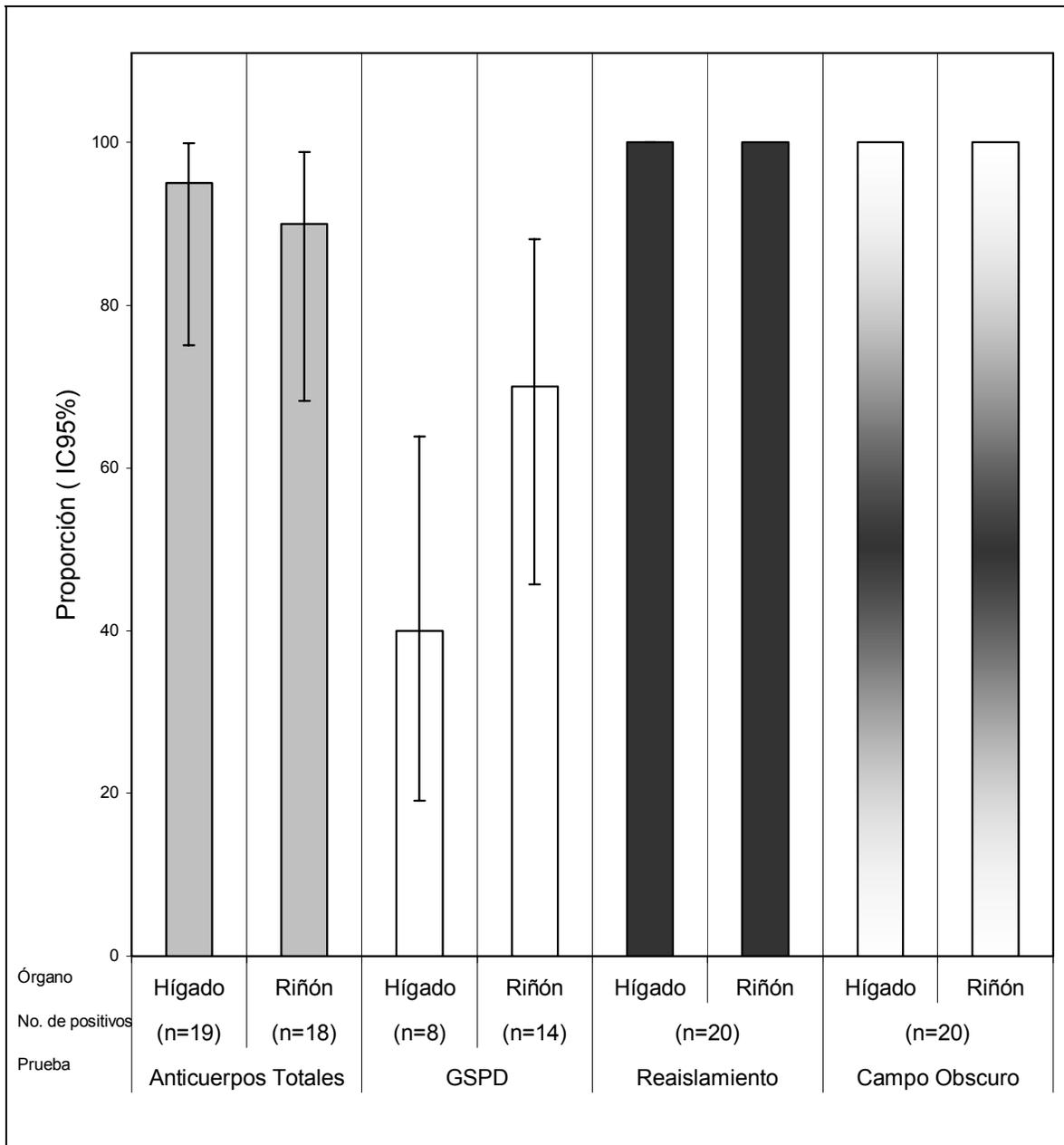


Figura 13. Proporción de los resultados obtenidos de las pruebas de Inmunohistoquímica con anticuerpos totales, anti-GspD_L, reislamiento y observación de Leptospiras en macerados de tejidos tanto en hígado como en riñón.

9. DISCUSIÓN

Investigaciones sobre proteínas de la membrana externa expresadas por *Leptospira* durante la infección aportan información para el conocimiento de la patogénesis y para el desarrollo de inmunógenos contra la leptospirosis.

Con base en el hallazgo de nuevas PMEs realizado por Cullen *et al.*, (2002) y en particular con los datos de espectrofotometría sobre pL18, De la Peña-Moctezuma¹ realizó un análisis bioinformático del genoma de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjobovis L550 donde se reveló que pL18 es un homólogo de GspG, una proteína del T2SS, semejante al pili tipo IV (pseudopilina). GspG está involucrada en el proceso final de secreción proteica por polimerización de subunidades para formar una estructura semejante a un pistón que se encarga de expulsar las proteínas previamente sintetizadas en el periplasma y translocadas al espacio periplásmico por el sistema Sec, hacia el exterior a través de GspD, la secretina del T2SS (Cianciotto, 2005). El análisis bioinformático reveló además la presencia de 14 MALs en el operón *gsp* de Hardjobovis. Recientemente Rodríguez (2007 a), evaluó su antigenicidad, demostrando que efectivamente es una proteína antigénica en humanos, bovinos, caninos, conejos y hámsteres. El hecho de que GspD sea la única proteína de este sistema que en diferentes bacterias Gram negativas se ubica en la superficie de la membrana externa y que su integridad es fundamental para el óptimo funcionamiento de esta ruta de secreción bacteriana sugiere su potencial utilidad como un inmunógeno.

El objetivo de este estudio fue comprobar que la secretina GspD del T2SS de *Leptospira* era realmente expresada durante la infección siendo detectada en cortes histológicos de riñón e hígado mediante inmunohistoquímica.

Previamente, en nuestro laboratorio se logró amplificar por PCR, el gen codificante, clonarlo en un vector de expresión de la serie pET28a (Novagen) y expresar *in vitro* la secretina GspD de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo, Hardjobovis L550 (Rodríguez, 2007 a). Utilizando la metodología propuesta por

¹ Comunicación personal

Rodríguez, (2007 a) y una cepa recombinante de *E. coli* Rosetta codon plus se obtuvo la expresión de rGspD_L de *Hardjibovis* L550.

La mejor respuesta para inducir la expresión de rGspD_L fue utilizando IPTG 5mM en LB Ka, Cl con *E. coli* Rosetta pAL208 durante 16 h a 37°C. A pesar de que, para los propósitos de éste estudio, la purificación de la proteína rGspD_L mediante electro-elución fue adecuada, este procedimiento fue muy lento y laborioso. La búsqueda de una mejor ruta, donde se logre su purificación de una manera más adecuada y ágil es necesaria. Alternativas para una mejor producción de la proteína recombinante incluyen la adición de rifampicina en una relación de 50 µg/ml durante la inducción con IPTG (Lama and Carrasco, 1992). Utilizando esta estrategia, Rodríguez *et al* (2007 b), encontraron una mayor producción de rGspD_L en contraste con cultivos sin rifampicina. Dicho estímulo es debido a que se inactiva la ARN polimerasa de *E. coli* mediante la acción del antibiótico rifampicina mientras que, la T7 ARN polimerasa en el plásmido pET28a se muestra refractaria a la acción inhibitoria de la rifampicina por lo que continúa transcribiendo al gen clonado ubicado sobre el vector. Por otro lado, la deficiente purificación de rGspD_L a partir de sonicados de bacterias transformadas con el constructo en el vector de expresión pET28a, es debido al plegamiento de la proteína recombinante que enmascara el péptido de poli-histidina presente en su porción amino. Para solventar este problema, pudiera optarse por el uso de otras versiones del vector de expresión de la serie pET o bien de otros vectores de expresión. Las dos cepas que se utilizaron para este estudio fueron, una procedente de un perro asintomático (46) y la otra procedente del riñón de un perro que murió de leptospirosis (C59). La cepa 46 fue parte de los resultados de un estudio de frecuencias de estados de portadores asintomáticos en perros, en donde se obtuvo un 6.89% (n=58) de aislamientos procedentes de muestras de orina o riñones de perros sin signología, destinados al sacrificio, en el Centro de Control Canino, Luis Pasteur, al norte de la ciudad de México (Castillo *et al.*, 2006). Dichos aislados (4) mostraron virulencia cuando fueron inoculados en hámsteres y resultó la cepa 46 un elemento indispensable para el estudio de la expresión de antígenos específicos de *Leptospira* durante la infección. Por otro lado, la cepa C59 fue un

aislado obtenido del riñón de un perro criollo de 10 años de edad, el cual presentó vómito y una masa en abdomen de lado derecho, azotemia renal y en la serología títulos altos de *Leptospira*. Ambos aislados fueron parcialmente caracterizados mediante la prueba de aglutinación microscópica con sueros inmunes y cepas de referencia como *L. interrogans* sv Canicola (Castillo *et al.*, 2006).

Las lesiones producidas en hámsteres que se observaron concuerdan con las lesiones reportadas por van den Ingh and Hartman (1986), Thompson and Manktelow (1989) y Faine *et al.*, (1999).

Las lesiones macroscópicas provocadas por ambas cepas (C46 y C59) fueron similares y aunque en términos generales más graves en la cepa C46, se observó una diferencia estadística significativa en la lesión de congestión de los riñones (χ^2 $p=0.0009$).

La diferencia en virulencia entre C46 y C59 no fue posible evaluarla estadísticamente debido a que el número de individuos fue pequeño ($n=10$). Sin embargo, obteniendo la proporción por órgano y tipo de lesión se observó diferencia en la presentación hemorragia renal, donde la cepa C46 fue proporcionalmente superior a C59 con una $p=0.05$. Esta diferencia entre la virulencia de C46 y C59 se puede deber a que probablemente C46 siendo una cepa adaptada al hospedero (aislada de un individuo asintomático), aumentó su virulencia al buscar su adaptabilidad al hámster (huésped accidental), algo comúnmente observado en especies no adaptadas a huésped (Faine *et al.*, 1999; Adler and de la Peña Moctezuma, 2004).

Se obtuvo el 100% de aislamiento en el medio Fletcher, tanto del macerado de riñón como de hígado, así como en la observación de leptospiras en microscopía de campo oscuro, lo que demostró la infección de los hámsteres y aseguró la presencia de leptospiras patógenas correspondientes a la cepa de desafío y utilizadas posteriormente para evaluar la prueba de inmunohistoquímica, en forma semejante a lo reportado por Haake *et al.* (1991) y Palaniappan *et al.*, (2005). Si bien no hubo diferencia detectable estadísticamente entre los resultados de cultivo y los de inmunohistoquímica en el ensayo de infección en hámsteres ($p > 0.05$) esto no necesariamente pudiera ser semejante a lo potencialmente observable en

muestras de campo. Es bien conocida la dificultad en el aislamiento de *Leptospira* a partir de muestras clínicas, en donde la utilidad de una prueba alternativa como la inmunohistoquímica es de gran valor. El hecho de haber recuperado el microorganismo en cultivo a partir del 100% de los órganos de los animales inoculados sólo es derivado de las condiciones experimentales aplicadas y no un reflejo de lo que es observable en muestras clínicas.

La técnica de inmunocitoquímica (ICQ) aplicada sobre frotis de *L. interrogans* serovariedades Hardjoprajitno y Canicola fue estandarizada en primera instancia para comprobar la reactividad del anticuerpo primario anti GspD_L hacia leptospiros; dado que este anticuerpo fue obtenido a partir de una proteína recombinante expresada en *E. coli* y se obtuvo a partir de un amplificado de PCR del genoma de *L. borgpetersenii* sv Hardjobovis (Rodríguez *et al.*, 2005; Rodríguez, 2007 a). Por otro lado, la ICQ fue útil para demostrar la capacidad de reconocimiento del antígeno GspD en la superficie de leptospiros, observándose mayor reactividad hacia *L. interrogans* serovariedad Hardjoprajitno que hacia Canicola.

La ICQ demostró que el anticuerpo primario fue capaz de detectar GspD_L en las leptospiros en cultivos *in vitro*, en tanto que, los aislamientos a partir de hígado y riñón permitieron asegurar la presencia del microorganismo inoculado en los hámsteres. Los hallazgos patológicos anteriormente descritos demostraron el establecimiento característico de una leptospirosis aguda en el modelo de infección en hámster.

Posteriormente, se siguieron los mismos pasos para la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) y en forma paralela fue estandarizada para dos anticuerpos; una para la detección de antígenos totales, suero inmune anti-C46 y otra específica para GspD_L de *Leptospira*. La IHQ para la detección de antígenos totales permitió establecer la correcta detección del microorganismo en los tejidos infectados de los animales inoculados donde el 95% de cortes de hígado y el 90% de cortes de riñón de las muestras de los animales inoculados fueron positivos. Las espiroquetas fueron detectadas en todos los hámsteres y finalmente se demostró que el procesamiento de los tejidos para la IHQ en general permitió la

detección del microorganismo a través de sus antígenos de superficie como lo han reportado previamente Scanziani *et al.*, (1989); Haake *et al.*, (2000) y Wild *et al.*, (2002).

La IHQ para la detección de GspD_L siguió los mismos pasos que para la detección de antígenos totales, encontrando que la detección de la proteína específica GspD_L, fue positiva en el 40% de los cortes de hígado y el 70% de los cortes de riñón, donde GspD_L en hígado solamente fue detectada en los hámsteres que murieron en los días 3 y 4, en tanto el riñón, aunque no se logró detectar en todos los animales, sí detectó a los animales que murieron el día 3 así como en los que sobrevivieron hasta el día 9. Esto sugiere que la expresión de la proteína GspD_L puede variar dependiendo de la cantidad del microorganismo, tipo de ambiente en que se encuentre; *in vitro* o *in vivo*, el tipo de tejido, así como el estado de virulencia de la bacteria. La comparación de los resultados obtenidos en el análisis estadístico comparando el aislamiento del microorganismo y observaciones por microscopía de campo oscuro y la realización de la IHQ utilizando el anticuerpo anti-total, demostraron una concordancia con la IHQ con el anticuerpo anti-GspD_L, lo que sugiere que esta técnica es adecuada para la detección de dicha proteína, tanto en el modelo *in vitro* como *in vivo* para ser utilizada como herramienta para verificar cambios en la expresión de la misma según lo observado en la diferencia de resultados en su detección en hígado y riñón. Sin embargo, con fines de diagnóstico fue superior la IHQ utilizando suero inmune con antígenos totales, anti-C46.

Se observó en otros estudios, que después de realizar pruebas de IHQ con tejidos de hámsteres inoculados experimentalmente y a los cuales se les practicó la eutanasia, se exhibió una mejor respuesta con los tejidos que estuvieron expuestos más tiempo a la infección (Barnett, *et al.*, 1999, Haake *et al.*, 2000). Haake *et al.*, (1991) realizaron estudios con antígenos de membrana externa, encontraron que dependiendo de, si se encontraban atenuadas o virulentas, las leptospiras presentaban en mayor o menor cantidad el antígeno de membrana externa. Ahora bien, el hecho que se encuentren proteínas en la membrana externa no se asegura su reconocimiento, tal es el caso de LipL36 que no se

detectó en tejidos de riñón de hámsteres infectados a través de inmunohistoquímica, indicando que la expresión de LipL36 era regulada *in vivo* (Barnett *et al.*, 1999). Por otro lado, se demostró mediante inmunohistoquímica en tejidos renales que LigA se expresó sólo *in vivo* en comparación con cultivos *in vitro* donde no se detectó por inmunotransferencia, lo que sugiere que LigA sólo se expresa durante la infección (Palaniappan *et al.*, 2002).

En este estudio se pudo comprobar que GspD_L se expresó durante la infección mediante la técnica de IHQ en tejidos renal y hepático de hámster, en concordancia con lo que se reportó con otras proteínas de membrana externa, tal es el caso de LipL32 (Haake *et al.*, 2000), OmpL1 y LipL41 (Barnett *et al.*, 1999) son proteínas de membrana externa que se expresaron en altos niveles durante el cultivo *in vitro* y la infección *in vivo*, lo cual se demostró mediante inmunohistoquímica.

Sueros de humanos con leptospirosis tuvieron una fuerte respuesta de anticuerpos contra LipL32, con esto se sugirió que esta proteína puede ser utilizada para el desarrollo de nuevas herramientas serológicas para el diagnóstico de leptospirosis (Haake *et al.*, 2000). Rodríguez (2007 a) igualmente detectó anticuerpos del tipo IgG dirigidos contra GspD de *Hardjobovis* en los sueros de individuos con títulos superiores a 1:200 en la prueba de AM. Se reportó que durante la infección se generaron anticuerpos contra OmpL1, LipL41, LipL32, LipL45 y LigA. (Flannery *et al.*, 2001; Guerreiro *et al.*, 2001), lo cual sugiere que pueden ser utilizadas como una herramienta para el diagnóstico y prevención de leptospirosis. Recientes estudios demostraron que T2SS puede ser un factor de virulencia para humanos y animales (Cianciotto, 2005). Diversas toxinas y enzimas extracelulares son secretadas por este sistema de secreción. Se realizaron estudios en bacterias que utilizan el T2SS para la secreción de enterotoxinas, donde se observó que son secretadas toxinas a través de GspD (Horstman and Kuehn, 2002; Tauschek *et al.*, 2002). *Leptospira* igualmente sintetiza diversas enzimas las cuales podrían ser secretadas a través del T2SS. Debido a su importante participación en el proceso de secreción de proteínas, así como a su ubicación sobre la ME, la secretina GspD_L del T2SS de *Leptospira*, es un antígeno de interés para estudios de

antigenicidad e inmunogenicidad, así como para estudios que nos permitan entender el tipo de proteínas secretadas y así su potencial papel en patogenicidad y fisiología.

La membrana externa contiene numerosas lipoproteínas, las cuales se encuentran conservadas entre diferentes serovariedades patógenas. Se demostró que algunas de estas, estimularon una inmunidad parcial en modelos animales; por ejemplo LipL32 proporcionó protección parcial en gerbos durante la fase aguda (Branger *et al.*, 2005), mientras que LipL41 mostró un sinergismo de inmunoprotección con OmpL1, aunque separadas no proporcionaron protección (Haake *et al.*, 1999). PMEs de leptospiras constituyen un atractivo candidato para vacunas debido a que se encuentra conservada entre diversas especies patógenas (Cullen *et al.*, 2004). La proteína de superficie, GspD es una proteína funcional en contraste con algunas lipoproteínas que aparentemente funcionan sólo como proteínas estructurales que generan respuesta inmune. De tal forma que, por un lado resulta promisorio generar opsonofagocitosis y por el otro un bloqueo funcional inmunológico. Recientemente Rodríguez (2007 a) realizó un ensayo piloto de inmunoprotección con rGspD_L en el modelo de hámster revelando una supervivencia del 100 % de los animales inmunizados con rGspD_L contra un 33.0 % del grupo testigo. Sin embargo, todos los sobrevivientes presentaron colonización renal con leptospiras.

La estandarización de un inmunoensayo enzimático, utilizando sueros de animales infectados puede ser considerada como un candidato para estandarizar una prueba diagnóstica. El ensayo enzimático dirigido a la detección de anticuerpos anti-GspD en combinación con una cinética de infección en hámsteres mediante IHQ, podría generar información sobre la rapidez con la que se genera la respuesta anti-GspD, en contraste con el establecimiento de leptospiras patógenas en tejidos, en particular el riñón. Es en los túbulos contorneados en donde el microorganismo puede alojarse en un sitio externo al sistema inmune y permanecer por periodos prolongados, siendo eliminados al medio y favoreciendo la persistencia de leptospirosis en áreas definidas. El análisis de respuesta

humoral dirigidas contra antígenos de leptospira es ideal para la identificación de la expresión de proteínas durante la infección.

Mena (2006), identificó y secuenció los genes *gspD* y *gspE* en *Leptospira biflexa* serovariedad Patoc observando una similitud del 46% con sus homólogos en leptospiras patógenas, sugiriendo que el T2SS puede jugar un papel importante para su sobrevivencia fuera y dentro del hospedero. Ensayos de mutagénesis dirigida contra *gspD* en *L. biflexa*, generarían información sobre el tipo de proteínas que son secretadas a través de este importante sistema.

El diagnóstico de la leptospirosis es difícil, uno de los métodos más utilizados es la serología, que se basa en la detección de anticuerpos, principalmente aglutininas del tipo IgM en suero mediante la prueba de aglutinación microscópica (AM), los cuales alcanzan títulos detectables de los 7 a los 10 días de iniciada la infección. La posibilidad de estar en contacto con leptospiras a lo largo de la vida de un individuo es muy alta, por consiguiente, no es rara la detección de anticuerpos aglutinantes con títulos bajos, considerados inespecíficos en individuos sanos o con signología igualmente inespecífica. Cuando la infección es activa se requiere de la detección de un incremento en 4 veces el título inicial de anticuerpos en una segunda muestra de suero colectada 14 días posteriores a la primera toma (Levett, 2001; Bharti *et al.*, 2003), lo cual resulta con frecuencia impráctico. La prueba diagnóstica definitiva es el aislamiento del agente, siendo en el caso de *Leptospira* tardado (semanas a meses y dependiente de la fragilidad de ésta espiroqueta). Durante la fase leptospirémica se aíslan microorganismos de sangre y órganos, tales como hígado y riñón. Después de la segunda semana, el aislamiento es de órganos y de orina (Levett, 2001, Adler and De la Peña-Moctezuma, 2004). Otro método diagnóstico es a través de la detección del ADN, mediante técnicas de hibridación o mediante PCR (Bharti *et al.*, 2003). Otra alternativa de diagnóstico de leptospirosis es el desarrollo de técnicas inmunológicas para detectar a leptospiras de manera directa. La técnica de inmunohistoquímica permite la identificación, sobre muestras tisulares o citológicas, de determinantes antigénicos. La aplicación directa de anticuerpos policlonales o monoclonales sobre secciones tisulares permite la localización

histológica de su expresión y su correlación con los parámetros morfológicos, aumentando la sensibilidad y especificidad del estudio y proporcionando información adicional esencial en muchos casos (Haines and Chelack, 1991). El empleo de la técnica de inmunohistoquímica CAB-P incrementa la sensibilidad para la identificación del antígeno en tejidos conservados. Tejidos fijados en formalina e inmersos en parafina proveen una excelente preservación en la arquitectura del tejido. El inconveniente que se tiene con la fijación de formalina es la pérdida de los sitios antigénicos; el tratamiento para la recuperación de dichos sitios, se realiza con el empleo de diferentes enzimas o amortiguadores, tales como pronasa, tripsina o buffer de citratos, obteniendo muy buenos resultados (Barnett *et al.*, 1999; Gimeno *et al.*, 2005).

La IHQ se empleó para detectar proteínas de membrana externa o antígenos totales de *Leptospira* obteniendo muy buenos resultados (Barnett *et al.*, 1999; Haake *et al.*, 2000; Wild *et al.*, 2002).

En un estudio donde se evaluó la colonización en perros vacunados y no vacunados, se utilizaron, PCR, hibridación fluorescente *in situ* e IHQ y se observó una fuerte relación entre los resultados obtenidos de esas pruebas (Goldstein *et al.*, 2007).

El presente trabajo representa el primer reporte donde una inmunohistoquímica es desarrollada para la detección de GspD del T2SS en la superficie de leptospiras patógenas en un modelo de infección *in vivo*. El uso de anticuerpos dirigidos contra la proteína GspD de *L. borgpetersenii* sv Hardjo Hardjobovis L550 fueron útiles para demostrar la expresión de GspD en los tejidos de hámster infectados por *L. interrogans* sv Canicola cepas C46 y C59, no obstante de ser leptospiras de diferente especie en donde existe un 92% de homología en las secuencias de aminoácidos entre ambas especies. Igualmente, se logró detectar de manera contundente la presencia de leptospiras mediante IHQ, utilizando el anticuerpo anti-C46, lo cual sugiere que ésta técnica permite ser utilizada como una herramienta para el diagnóstico de *Leptospira* en tejidos.

Como se mencionó anteriormente, la inmunohistoquímica es aplicable en tejidos y células, gran parte de estas muestras se realizan en animales muertos o bien, por

medio de biopsia, lo cual resulta impráctico en ocasiones, es por esto, que la utilización de esta técnica en otras muestras tales como, orina o sangre podrían ser de gran utilidad para el diagnóstico de leptospirosis.

10. CONCLUSIONES

La técnica de inmunohistoquímica demostró que la secretina GspD del T2SS de *Leptospira* es expresada durante la infección permitiendo la detección del organismo en tejidos renal y hepático de hámsteres infectados experimentalmente.

Se logró la estandarización de la prueba de inmunohistoquímica utilizando el suero anti-GspD_L así como el suero anti-total (C46).

El suero inmune contra antígenos totales anti-C46 es útil para emplearlo en ensayos de inmunohistoquímica con fines diagnósticos de leptospirosis.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Adler B, De la Peña-Moctezuma A. *Leptospira*. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. Pathogenesis of bacterial infections in animals. New York: Blackwell Publishing, 2004: 385-396.
2. Ashford DA, Kaiser RM, Spiegel RA, Perkins BA, Weyant RS, Bragg SL, Plikaytis B, Jarquin C, de los Reyes JO, Amador JJ. Asymptomatic infection and risk factors for leptospirosis in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 63: 249-254.
3. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Current protocols in molecular biology. USA: John Wiley and Sons, Inc., 1996.
4. Ballard SA, Williamson M, Adler B, Vinh T, Faine S. Interactions of virulent and avirulent leptospires with primary cultures of renal epithelial cells. *J Med Microbiol* 1986; 21: 59-67.
5. Baranton G, Old IG. The spirochaetes: a different way of life. *Bulletin Institut Pasteur* 1995; 93: 63-95.
6. 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 in hamsters. *Infect Immun* 1999; 67:853–886.
7. Barocchi MA, Ko AI, Reis MG. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but non intracellular pathogen. *Infect Immun* 2002; 70:6926-6932.
8. Bernard WV. Leptospirosis. *Veterinary clinics of North America: equine practice* 1993; 9:35-43.
9. Bharti A, Nally J, Ricaldi J, Matthias M, Diaz M, Lovett M, Levett P, Gilman R, Willig M, Gotuzzo E, Vinetz J. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infect Dis* 2003; 3:757-771.
10. Bolin AC, Prescott JF. Leptospirosis. In: Howard JL, Smith RA. *Current Veterinary Therapy*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1999; 325-358.

11. Branger C, Chatreinet B, Gauvrit A, Aviat F, Aubert A, Bach JM, André-Fontaine G. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. *Infect Immun* 2005; 173:4062–4069.
12. 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. In *J Sys Bacteriol* 1999; 49:839–858.
13. Brod CS, Guimarães JAA, Dorneles SD, Hartleben CPF, Rodrigues JLT, Dellagostin OA. Evidence of dog as a reservoir for human leptospirosis: a serovar isolation, molecular characterization and its use in a serological survey. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38: 294-300.
14. Bulach DM, Kalambaheti T, de la Peña Moctezuma A, Adler B. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Leptospira*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2000; 2: 375-380.
15. Burth P, Younes-Ibrahim M, Gonzalez F. Purification and characterization of a Na⁺, K⁺ ATPase inhibitor found in an endotoxin of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 1997; 65:1557-1560.
16. Butrón GDH, de la Peña Moctezuma. Frecuencia de *Leptospira* spp., *Ancylostoma* spp. y parvovirus canino en perros con vómito y diarrea hemorrágica. *Rev Vet Asoc Med Vet Esp Peq Esp* 1991; 6: 9-14.
17. Castillo SLO, Roa CRMA, De la Peña-Moctezuma A. Detección de leptospiras patógenas en perros. 27-29 de noviembre de 2006. Guadalajara, Jalisco. XXX Aniversario del CIBO Instituto Mexicano del Seguro Social. Centro de Investigación Biomédica de Occidente.
18. Cianciotto NP. Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *TRENDS Microbiol* 2005; 13: 581-588.
19. Colin OR. Seroprevalencia a leptospiras en trabajadores del sistema municipal de los servicios de agua potable y alcantarillado. Guadalajara, México. IMSS, Universidad de Guadalajara, INDRE, SSA, México, 1997.

20. Cooper M, Paterson Y. Production of polyclonal antisera. In: Ausubel M, Brent R, Kingston E. Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & sons 2003.
21. Cullen JM, McLachlan NJ. In: McGavin MD, Carlton WW, Zachary JF. Thomson's special veterinary pathology. Missouri: Mosby, 2001:81-105.
22. 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.
23. Cullen PA, Haake DA, Adler B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. FEMS Microbiol Rev 2004; 28: 291-318.
24. Cullen PA, Haake D, Bulach D. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. Infect Immun 2003; 71: 2414-2421.
25. de la Peña-Moctezuma A, Bulach DM, Kalambaheti T, Adler B. Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* subtype Hardjobovis. FEMS Microbiol Lett 1999; 177: 319-326.
26. Dobrina A, Nardon E, Vecile E. *Leptospira icterohaemorrhagiae* and leptospire peptidoglycans induce endothelial cell adhesiveness for polymorphonuclear leukocytes. Infect Immun 1995; 63: 2995-2999.
27. Driessen AJ. SecB, a molecular chaperone with two faces. Trends Microbiol 2001; 9:193-196.
28. Faine S. *Leptospira*. In: Collier L, Ballows A, Sussman M. Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. 9th ed. London: Bacterial Infections, 1998: 849-869.
29. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. 2a. Ed. Melbourne, Australia: MediSci 1999.
30. Farrelly HE, Adler B, Faine S. Opsonic monoclonal antibodies against lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. J Med Microbiol 1987; 23: 1-7.

31. [Fernandez CP](#), [Seixas FK](#), [Coutinho ML](#), [Vasconcellos FA](#), [Seyffert N](#), [Croda J](#), [McBride AJ](#), [Ko AI](#), [Dellagostin OA](#), [Aleixo JA](#). Monoclonal antibodies against LipL32, the major outer membrane protein of pathogenic *Leptospira*: production, characterization, and testing in diagnostic applications. [Hybridoma](#) 2007; 26:35-41.
32. Flannery B, Costa D, Pinheiro CF, Guerreiro H, Matsunaga J, Domingos Da Silva E, Gómes PFA, Riley LW, Reis MG, Haake DA, Ko AI. Evaluation of Recombinant *Leptospira* Antigen-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Serodiagnosis of Leptospirosis. *J Clinical Microbiol* 2001;39: 3303–3310.
33. Gimeno EJ, Massone AR, Portiansky EL. Introducción a las técnicas de inmunohistoquímica y aplicaciones en patología veterinaria. Decimoséptimo curso internacional de posgrado en técnicas de inmunohistoquímica, lectinhistoquímica y microscopía electrónica. 19-23 de septiembre de 2005. La Plata, Argentina. Instituto de Patología “Dr. B. Epstein” servicio central de microscopía electrónica “Dr. S. I. Itagaki”, 2005: 24-34.
34. Goldstein RE, Atwater DZ, Njaa BL. Assessment of renal colonization in vaccinated and non-vaccinated dogs experimentally infected with *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa. 5th meeting of the international leptospirosis society; 2007 september 17-20; Quito Ecuador: International leptospirosis society, 2007: 84.
35. Guerreiro H, Croda J, Flannery B. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun* 2001; 69: 4598-4968.
36. Haake DA, Champion CI, 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.
37. Haake D, Chao G, Zuerner R. The leptospiral outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* 2000; 68: 2276-2285.

38. 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.
39. Haake D, Matsunaga J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of the three novel leptospiral proteins. *Infect Immun* 2002; 70: 4936-4945.
40. Haake D, Mazel MK, McCoy A, Milward F, Chao G, Matsunaga J, Wagar EA. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun* 1999; 67: 6572-6582.
41. Haake DA, Walker EM, Blanco DR, Bolin CA, Miller JN, Lovett MA. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar Grippotyphosa during *in vitro* cultivation. *Infect Immun* 1991; 59: 1131-1140.
42. Haines DM, Chelack BJ. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J Vet Diagn Invest* 1991; 3: 101-112.
43. Hartman EG, van den Ingh TS, Rothuizen J. Clinical, pathological and serological features of spontaneous canine leptospirosis. An evaluation of the IgM and IgG specific ELISA. *Vet Immun Immunopathol* 1986; 13: 261-271.
44. 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.
45. Horstman AL, Kuehn MJ. Bacterial surface association of heat-labile enterotoxin through lipopolysaccharide after secretion via the general secretory pathway. *J Biol Chemistry* 2002; 277:32538-32545.
46. Isogai E, Isogai H, Fujii N, Oguma K. Biological effects of leptospiral lipopolysaccharide to mouse B cells, T cells and NK cells. *Japanese J Vet Science* 1990; 52: 923-930.

47. Johnson TL, Abendroth J, Hol WGJ, Sandkvist M. Type II secretion: from structure to function. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 255: 175-186.
48. Jones TC, Duncan RH, William KN. *Veterinary pathology*. USA: Williams and Wilkins, 1997.
49. Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227: 680-685.
50. Lama J, Carrasco L. Expression of poliovirus nonstructural proteins in *E. coli* cells. *J Biol Chem* 1992; 267: 15932-15937.
51. Lee SH, Kim KA, Park YK, Seong IW, Kim MJ, Lee YJ. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Gene* 2000; 254: 19-28.
52. Lee SH, Kim S, Park SC, Kim MJ. Cytotoxic Activities of *Leptospira interrogans* hemolysin SphH as a pore-Forming protein on mammalian cells. *Infect Immun* 2002; 70: 315-322.
53. Lee VT, Schneewind O. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes Develop* 2001; 15:1725-1752.
54. León-Lara L. Epidemiología, prevención y control de la leptospirosis en los animales domésticos. En: Rodríguez VRI. *Enfermedades de importancia económica en producción animal*. UAP México: Mc Graw Hill, 2005: 489-504.
55. Levett P. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 296-326.
56. a) Levett PN, Adler B, Hartskeerl R, Smythe L. Recent taxonomic changes in the genus *Leptospira*. 5th meeting of the international leptospirosis society; 2007 september 17-20; Quito Ecuador: International leptospirosis society, 2007: 15.
57. b) Levett PN Matthias MA, Ricaldi JN, Galloway RL, Steigerwalt AG, Vinetz JM. Isolation and characterization of a new *Leptospira* species from man and animals in the Peruvian Amazon. 5th meeting of the international leptospirosis society; 2007 september 17-20; Quito Ecuador: International leptospirosis society, 2007: 28.

58. Lin YP, Chang YF. Lig proteins that mediate attachment of *Leptospira* to the host cells to initiate infection. 5th meeting of the international leptospirosis society; 2007 september 17-20; Quito Ecuador: International leptospirosis society, 2007: 107.
59. 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.
60. Márquez ME, Valera BB, Luque MR, Alarcón GA. Lung involvement in leptospirosis. Arch Bronconeumol 2006, 42: 202-204.
61. Matsunaga J, Barocchi A, Croda J. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. Mol Microbiol 2003; 49: 929-945.
62. 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.
63. Medeiros MA, McBride FW, McBride AJ, Esteves GS, Figueira CP, Chagas AJ, Santos C, Homma A, Galler R, Reis MG, Ko AI. Vaccine formulations of leptospiral immunoglobulin-like (Lig) proteins in aluminum hydroxide adjuvant confers sterilizing immunity in the hamster model for leptospirosis. 5th meeting of the international leptospirosis society; 2007 september 17-20; Quito Ecuador: International leptospirosis society, 2007: 83.
64. Mena RB. Análisis *in silico* de los genes *gspD* y *gspE* del sistema de secreción tipo II de *Leptospira biflexa* serovariedad Patoc. (Tesis de maestría) D.F. México: FMV-UNAM, 2006
65. Mejía ME, Barragán V, Zapata S, Trueba G. Interactions of pathogenic *Leptospira* with environmental bacteria. 5th meeting of the international leptospirosis society; 2007 september 17-20; Quito Ecuador: International leptospirosis society, 2007: 48.

66. Merien F, Baranton G, Perolat P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. *Infect Immun* 1997; 65:729-738.
67. Merien F, Truccolo J, Rougier Y, Baranton G, Perolat P. In vivo apoptosis of hepatocytes in guinea pigs infected with *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 169:95-102.
68. Moles-Cervantes PL. Leptospirosis porcina. Experiencias en un brote de leptospirosis porcina. Memorias "Simposio internacional sobre *Leptospira* y leptospirosis en las Américas, México 2004"; México D.F.: UNAM-FMVZ, UAM-Xochimilco, INDRE-SSA, CENID-Microbiología-INIFAP, SENASICA-SAGARPA. México D.F., 2004: 62-64
69. 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.
70. Nally J, Timoney J, Stevenson B. Temperature-regulated protein synthesis by *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 2001; 69: 400-404.
71. Nascimento LTO, 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, Goldman MHS, Harakava R, Jerónimo SMB, Junqueira-de-Azevedo ILM, Kimura ET, Kuramae EE, Lemos EGM, Lemos MVF, Marino CL, Nunes LR, de Oliveira RC, Pereira GG, Reis MS, Schriefer A, Siqueira WJ, Sommer P, Tsai SM, Simpson AJG, Ferro JA, Camargo LEA, Kitajima JP, Setubal JC, Van Sluys MA. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J Bact* 2004; 186:2164–2172.
72. Navarro CEK, Kociba GJ, Kowalski JJ. Serum biochemical changes in dogs with experimental *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae infection. *Am J Vet Res* 1981; 42: 1125-1129.

73. 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.
74. Palaniappan RUM, Chang YF, Chang CF, Pan MJ, Yang CW, Harpending P, McDonough SP, Dubovi E, Divers T, Qy J, Roe B. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospiaras. *Molecular Cellular Probes* 2005; 19: 111-117.
75. PasteurInstitut.org (homepage on the Internet) Paris: Unité de Bactériologie Moléculaire et Médicale, 2006. Available from: <http://www.pasteur.fr/recherche/Leptospira/Leptospira.html>.
76. 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.
77. Prescott JF. Leptospirosis. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. *Pathology of domestic animals*. San Diego:Academic Press, 1993: 503-510.
78. Pugsley AP, Francetic O, Possot OM, Sauvonet N, Hardie KR. Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative bacteria - a review. *Gene* 1997; 192:13-19.
79. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ. *Veterinary microbiology and microbial disease*. England: Blackwell Science, 2002.
80. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. *Veterinary medicine*. 9th ed. London: WB Saunders, 1999.
81. Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF, Jiang HQ, Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z, Sheng HH, Yin HF, Zhang Y, Zhu GF, Wan M, Huang HL, Qian Z, Wang SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QCh, Guo XK, Danchin A, Saint Girons I, Somerville RL, Wen YM, Shi MH, Chen Z, Xu JG, Zhao GP. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 2003;422:888-893.

- 82.a) Rodríguez REA. Antigenicidad de la proteína de membrana externa GspD_L, la supuesta secretina del T2SS de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo Hardjobovis. (Tesis de Doctorado). D.F. México: FMV-UNAM, 2007.
- 83.b) Rodríguez REA, Castillo SLO, Alcaraz SLE, Cullen PA, Bulach DM, Adler B, Haake DA, de la Peña-Moctezuma A. GspD_L, the type two secretion system (T2SS) secretin of *Leptospira* is expressed during infection. Rev Lat Microbiol (próxima publicación).
84. Rodríguez REA, Cullen P, Bulach DM, Adler B, Haake D, De la Peña-Moctezuma A. Expresión en *E. coli* del gen *gspD_L* del sistema de secreción tipo II de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardobovis). Rev Cubana Med Trop 2005; 57:45-46.
85. Sambrook J, Fritsh Ef, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2º. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
86. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning laboratory manual. 3th ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
87. Sandkvist M. Biology of type II secretion. Mol Microbiol 2001; 40:271-283.
88. Sandkvist M. Type II secretion and pathogenesis. Infect and Immun 2001; 69: 3523-3535.
89. Sauvonnet N, Vignon G, Pugsley AP, Gounon P. Pilus formation and protein secretion by the same machinery in *Escherichia coli*. EMBO J 2000; 19:2221-2228.
90. Scanziani E, Sironi G, Mandelli. Immunopeoxidase studies on leptospiral nephritis of swine. Vet Pathol 1989; 26: 442-444.
91. Segers RPAM, Van Der Drift A, De Nijs A, Corcione P, Van Der Zeijst BAM, Gaastra W. Molecular analysis of sphingomyelinasa C gene from *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. Infect Immun 1990; 58: 2177-2185.
92. 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. Infec Immun 1995; 63 (8): 3174-3181.

93. Shang ES, Summers TA, Haake DA. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41 a surface exposed lipoprotein of *Leptospira* species. *Infect Immun* 1996; 64: 2322-2330.
94. Sonrier C, Branger C, Michel V, Ruvoën-Clouet N, Ganière JP, André - Fontaine G. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. *Vaccine* 2001; 19:86-94.
95. Sitprija v, Pipatanagul V, Mertowidjojo K, Boonpucknavig V, Boonpucknavig S. Pathogenesis of renal disease in leptospirosis: clinical and experimental studies. *Kidney Int* 1980; 17: 827-836.
96. 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 Natl Acad Sci* 2002; 99: 7066-7071.
97. Thanassi DG, Hultgren SJ. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Cell Biol* 2000; 12: 420-430.
98. Thompson JC, Manktelow BW. Pathogenesis of renal lesions in hemoglobinaemic and non-haemoglobinaemic leptospirosis. *J Comp Path* 1989; 101: 201-214.
99. Trevejo RT, Rigau PJG, Ashford DA, McClure EM, Jarquín CG, Amador JJ, de los Reyes JO, Gonzalez A Zaki SR, Shieh W, McLean RG, Nasci RS, Weyant RS, Bolin CA, Bragg SL, Perkins BA, Spiegel RA. Epidemic Leptospirosis Associated with Pulmonary Hemorrhage-Nicaragua, 1995. *J Infect Dis* 1998; 178: 1457-1463.
100. Trueba G, Zapata S, Madrid K, Cullen P, Haake D. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int Microbiol* 2004; 7:35–40.
101. van den Ingh TS, [Hartman EG](#). Pathology of acute *Leptospira interrogans* serotype icterohaemorrhagiae infection in the syrian hamster. *Vet Microbiol* 1986; 12: 367-376.

102. Vinh T, Faine S, Adler B. Adhesion of leptospores to mouse fibroblasts (L929) and its enhancement by specific antibody. *J Med Microbiol* 1984; 18: 73-85.
103. Vinh TU, Adler B, Faine S. Glycolipoprotein cytotoxin from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *J Gen Microbiol* 1986; 132: 111-123.
104. Wild CJ, Greenlee JJ, Bolin CA, Barnett JK, Haake DA, Cheville NF. An improved immunohistochemical diagnostic technique for canine leptospirosis using antileptospiral antibodies on renal tissue. *J Vet Diag Invest* 2002; 14:20–24.
105. Wu MS, Yang CW, Pan MJ, Chang CT, Chen YC. Reduced renal Na⁺-K⁺-Cl⁻ co-transporter activity and inhibited NKCC2 mRNA expression by *Leptospira shermanii* from bed-side to bench. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 2472–2479.
106. Yang CW, Wu MS, Pan MJ. *Leptospira* outer membrane protein activates NF-kappa B and downstream genes expressed in medullary thick ascending limb cells. *J Amer Society of Nephrol* 2000; 11: 2017-2026.
107. Yang CW, Wu MS, Pan MJ. Leptospirosis renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 73-77.

APÉNDICE1. BASE DE DATOS

Lesiones macroscópicas por individuo y por órganos.

Individuo	Clasificada por grado de lesión 0= Negativo, 1= ligero, 2=moderado, 3=severo					Cuenta total de positivos (1) o negativos (0) a la lesión				
	Congestión			Hemorragias		Congestión			Hemorragias	
	Hígado	Riñón	Pulmón	Riñón	Pulmón	Hígado	Riñón	Pulmón	Riñón	Pulmón
H1C46	2	3	0	1	3	1	1	0	1	1
H2C46	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1
H3C59	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
H4C59	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
H5C46	2	0	0	0	1	1	0	0	0	1
H6C46	2	1	0	1	1	1	1	0	1	1
H7C59	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
H8C59	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
H9C46	2	3	0	3	1	1	1	0	1	1
H10C46	2	1	0	3	1	1	1	0	1	1
H11C59	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
H12C59	1	0	1	1	2	1	0	1	1	1
H13C46	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1
H14C46	1	3	2	3	2	1	1	1	1	1
H15C59	1	0	2	1	2	1	0	1	1	1
H16C59	1	0	2	1	2	1	0	1	1	1
H17C46	1	3	3	3	3	1	1	1	1	1
H18C46	1	3	3	3	3	1	1	1	1	1
H19C59	1	0	2	0	2	1	0	1	0	1
H20C59	1	0	2	0	2	1	0	1	0	1
	Total de positivos →					20	9	9	16	20
	Proporción (%) →					100	45	45	80	100

Lesiones microscópicas totales por órgano (hígado, pulmón y riñón), clasificadas como cambios hemáticos (congestión,

hemorragia, edema, trombo), infiltrados (linfocitos, neutrófilos y macrófagos) y cambios degenerativos (necrosis, degeneración tubular, proteína tubular) y regeneración*. Número de positivos** y Proporción***

Individuo	Hígado Cambios									Pulmón Cambios						Riñón Cambios									
	Hemáticos		Infiltrados			Degenerativos		Reg.*	Hemáticos		Infiltrados			Hemáticos			Infiltrados			Degenerativos					
	Congestión	Hemorragia	Linfocitos	Neutrófilos intersticiales	Macrófagos intersticiales	Necrosis	Degeneración de hepatocitos	Regeneración de hepatocitos	Congestión	Hemorragia	Edema intersticial	Edema perivascular	Linfocitos	Neutrófilos	Macrófagos	Congestión	Hemorragia	Trombo	Edema	Linfocitos	Neutrófilos	Macrófagos	Necrosis	Degeneración tubular	Proteína tubular
H1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
H2	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
H3	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
H4	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0
H5	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
H6	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
H7	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
H8	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1
H9	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1
H10	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1
H11	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1
H12	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1
H13	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
H14	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
H15	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
H16	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
H17	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
H18	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
H19	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1
H20	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
**No . (+)	18	6	3	15	19	13	15	5	12	18	12	11	13	17	20	19	13	6	8	14	13	20	14	20	1
***%	90	30	15	75	95	65	75	25	60	90	60	55	65	85	100	95	65	30	40	70	65	100	70	100	75

Resultados por individuo de inóculo (cepa utilizada, volumen, pase, fechas de inóculo y reinóculo), fecha de muerte, días de sobrevivencia, modo de muerte, reaislamiento (cultivo de hígado y riñón), resultados de IHQ contra antígenos totales de *Leptospira* e IHQ de GspD de *Leptospira* en hígado y riñón y grado de reacción *1= positivo, 0= negativo.

Individuo	Cepa del inóculo	Vol . de inóculo (ml)	Grupo	Fecha de inóculo	Fecha de reinóculo	Fecha de muerte	Reinoculación*	Días de sobrevivencia	Modo de muerte 0=Eutanasia, 1= Enfermedad	Reaislamiento*	Inmunohistoquímica Anti-C46 hígado*	Inmunohistoquímica Anti-C46 riñón*	Inmunohistoquímica GspD hígado*	Inmunohistoquímica GspD riñón*	Inmunohistoquímica GSPD hígado 0=neg, 1= pos débil, 2= positivo	Inmunohistoquímica GspD riñón. 0=negativo, 1= pos débil, 2=positivo
2006																
H1	46	0.5 -0,7	0	5/12	8/12	14/12	1	9	1	1	0	1	0	1	0	2
H2	46	0.5 -0,7	0	5/12	8/12	11/12	1	6	0	1	1	1	0	1	0	2
H3	59	0.5 -0,7	0	5/12	8/12	14/12	1	9	0	1	1	1	0	0	0	1
H4	59	0.5 -0,7	0	5/12	8/12	11/12	1	6	0	1	1	1	0	1	0	2
H5	46	0.5 -1,0	1	11/12	14/12	15/12	1	4	1	1	1	1	0	0	0	1
H6	46	0.5 -1,0	1	11/12	14/12	15/12	1	4	1	1	1	0	0	0	1	0
H7	59	0.5 -1,0	1	11/12	14/12	15/12	1	4	1	1	1	1	0	1	0	2
H8	59	0.5 -1,0	1	11/12	14/12	15/12	1	4	0	1	1	1	0	1	0	2
H9	46	2,0	2	15/12	-	18/12	0	3	1	1	1	1	1	1	2	2
H10	46	2,0	2	15/12	-	18/12	0	3	1	1	1	0	0	0	1	0
H11	59	2,0	2	15/12	-	18/12	0	3	0	1	1	1	1	1	2	2
H12	59	2,0	2	15/12	-	18/12	0	3	0	1	1	1	1	1	2	2
H13	46	1,0	3	18/12	-	22/12	0	4	1	1	1	1	1	1	2	2
H14	46	1,0	3	18/12	-	22/12	0	4	0	1	1	1	1	1	2	2
H15	59	1,0	3	18/12	-	22/12	0	4	1	1	1	1	0	0	0	1
H16	59	1,0	3	18/12	-	22/12	0	4	0	1	1	1	0	0	0	1
H17	46	1,0	4	21/12	-	24/12	0	3	0	1	1	1	1	1	2	2
H18	46	1,0	4	21/12	-	24/12	0	3	0	1	1	1	0	1	0	2
H19	59	1,0	4	21/12	-	24/12	0	3	0	1	1	1	1	1	2	2
H20	59	1,0	4	21/12	-	24/12	0	3	0	1	1	1	1	1	2	2
Total de positivos →									8	20	19	18	8	14		
Proporción (%) →									40	100	95	90	40	70		

13. APÉNDICE 2. SOLUCIONES Y MEDIOS

PREPARACIÓN DE MEDIOS

MEDIO LURIA BERTANI (LB) (Sambrook 1989)

Bacto triptona ¹	10 g
Extracto de levadura ²	5 g
Cloruro de sodio (NaCl) ³	5 g
*Bacto Agar ⁴	10-15 g

Disolver en 1,000 ml de agua destilada cada uno de los componentes.

Ajustar pH 7.0⁵ con un medidor de pH

Esterilizar por autoclave 121° C 15-20 min

*Este se agrega para preparar LB agar

¹ BD Difco

² Dibico

³ JT Baker

⁴ Merck

⁵ pHmeter Scientific Instruments Model 10

MEDIO SOB (Sambrook 1989)

Bacto triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	0.5 g
Cloruro de potasio (KCl) ⁶	10 ml (250mM) 1.86 g/100 ml H ₂ O dest

Disolver en 990 ml de agua destilada cada uno de los componentes.

Ajustar pH 7.0

Esterilizar por autoclave 121° C 15-20 min

Adicionar 20 ml de glucosa 1M (18 g/100ml H₂O destilada) estéril por membrana de 22 µm.

MEDIO SOC (Sambrook 1989)

Justo antes de utilizarlo adicionar 5 ml de MgCl₂ al medio SOB (19 g/ 100 ml) esterilizado por autoclave 121° C 15-20 min

⁶ High Purity

MEDIO FLETCHER (Myers, 1985)

Peptona ⁷	0.3 g
Extracto de carne ⁸	0.2 g
Cloruro de sodio (NaCl)	0.5 g
Agar	1.5 g
Agua destilada	920 ml
Suero de conejo	5-10%

El suero de conejo se esteriliza por filtración con membranas de 0.45 µm y 0.22 µm de diámetro y se inactiva a 56° C durante 30 min. El agua con las sales se esteriliza por autoclave 121° C 15-20 min. Finalmente se mezclan el suero con la mezcla de las sales y se distribuye en volúmenes de 5 ml en tubos estériles.

⁷ BD Difco

⁸ BD Difco

PREPARACIÓN DE AMORTIGUADORES

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS) PARA LAVADOS EN DIFERENTES TÉCNICAS

Se elabora a base de dos soluciones

A).- Solución de Sorensen

Fosfato de sodio anhidro ⁹	Na_2HPO_4	8.33g
Fosfato de potasio monobásico ¹⁰	KH_2PO_4	1.09g
Agua destilada		1000ml

B).- Solución salina fisiológica

Na Cl	8.5 g
Agua destilada	1000 ml

(A+B).- PBS

Solución salina fisiológica	460 ml
Solución Sorensen	40 ml

Distribuir en frascos y esterilizar por autoclave durante 15 min. El pH final debe ser de 7.4

⁹ JT Baker

¹⁰ JT Baker

**SOLUCIÓN DE TAE (TRIS / ACETATO / EDTA) 50X (pH ~ 8.5) PARA EL
CORRIMIENTO DE LA ELECTROFORESIS PARA PCR**

EDTA 0.5M	25 ml
Tris ¹¹	60.5 g
Ácido acético glacial ¹²	14.27 ml
Agua destilada	cbp 250 ml

Solución TAE de trabajo

Se utilizan 20 ml de la solución TAE 50X aforar a 1 litro con agua destilada

**AMORTIGUADOR DE CITRATOS (10mM CITRATO DE SODIO, 0.05% TWEEN
20, pH 6.0) PARA RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA EN INMUNOHISTOQUÍMICA**

$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ¹³	2.94 g
Agua destilada	1,000 ml

Mezclar hasta disolver, ajustar el pH 6.0 con 1M HCl y luego adicionar 0.5 ml de Tween 20¹⁴ y mezclar bien. Mantener a 4°C

¹¹ Invitrogen

¹² JT Baker

¹³ JT Baker

¹⁴ Sigma

SOLUCIONES PARA LA PREPARACIÓN DE SDS-PAGE

Acrilamida

30% Solución de acrilamida 29:1 (3.3%)¹⁵

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

Tris Base	54.45 g
Agua destilada	150 ml

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

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

Tris base	6.0 g
Agua destilada	50 ml

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

SDS al 10.0%

Disolver 10 g de SDS¹⁶ en 50 ml de agua destilada, agitar y aforar a 100 ml

Persulfato de amonio (NH₄)₂S₂O₈

Disolver 0.05 g de Persulfato de amonio¹⁷ en 0.5 ml de agua bidestilada estéril.

Se prepara y se utiliza en el momento

¹⁵ BioRad

¹⁶ Invitrogen

¹⁷ JTBaker

Amortiguador de muestra

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.0 ml
Glicerol ¹⁸	0.8 ml
SDS 10.0%	1.6 ml
2-Mercaptoethanol ¹⁹	0.4 ml
azul de bromofenol	0.02 g
Agua destilada	3.8 ml

Diluir la muestra en proporción 1:1 con el amortiguador de muestra.
Calentar a 100 °C durante 5 min antes de colocar en el pozo del gel
Preferentemente almacenar a 4 °C en un recipiente ámbar

Amortiguador para electroforesis 5X

Tris base	15.0 g
Glicina ²⁰	72 g
SDS	5.0 g
Agua destilada	1000 ml

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

Preparación del gel separador

¹⁸ Golden bell

¹⁹ Gibco BRL

²⁰ Invitrogen

Agua destilada	3.35 ml
Acrilamida 30.0%	4.0 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 ml
SDS 10.0%	100µl
Persulfato de amonio 10%	50µl
TEMED ²¹	5µl

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

Preparación del gel concentrador al 4%

Agua destilada	3.05 ml
Acrilamida 30.0%	0.67 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 ml
SDS 10.0%	50µl
Persulfato de amonio 10%	25µl
TEMED	5 µl

Ya polimerizado el gel separador se prepara esta mezcla.

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

²¹ Invitrogen

SOLUCIÓN TEÑIDORA DE AZUL DE COOMASIE

Etanol absoluto ²²	500ml
Ácido acético	100ml
Agua destilada	500 ml
Azul de Coomasie	0.55 g

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

SOLUCIÓN DESTEÑIDORA PARA LA TINCIÓN DE AZUL DE COOMASIE

Etanol absoluto	640 ml
Ácido acético	160 ml
Agua destilada	960 ml

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

²² JT Baker

SOLUCIONES PARA DETECCIÓN TIPO WESTERN

AMORTIGUADOR DE TOWBIN

Tris	3.023 g
Glicina	14.4 g
SDS	0.037 g
Metanol ²³	200 ml
Agua destilada	800 ml

Se coloca en un matraz 700 ml de agua bidestilada, el tris y la glicina. La mezcla se mantiene en agitación hasta que se disuelvan completamente las sales, se agrega el SDS, disminuyendo la velocidad de agitador magnético para evitar la formación de espuma, se afora a 800 ml. El amortiguador se mantiene en refrigeración hasta su uso. Antes de comenzar a utilizar el amortiguador de Towbin, se agregan 200 ml de metanol frío

AMORTIGUADOR SALINO DE TRIS-TWEEN 20 (TBS-T)

Tris HCl 1 M pH 7.5	20 ml
NaCl	1.8 g
Tween 20	100 µl

Se mezclan los componentes en 180 ml de agua estilada y se utiliza en el momento

²³ JT Baker

AMORTIGUADOR SALINO DE TRIS (*TRIS BUFFERED SALINE* (TBS))

Tris HCl 1M pH 8	20 ml
NaCl	1.8 g

Se mezclan los componentes en 180 ml de agua estilada y se utiliza en el momento

SOLUCIÓN DE REVELADO PARA INMUNODETECCIÓN TIPO WESTERN

TBS pH 8.0	100 ml
Metanol helado (-20 ° C)	20 ml
4-cloro-1naftol ²⁴	60 mg
peróxido de hidrógeno al 30.0 %	60 µl

Para el revelado se utilizaron 100 ml TBS pH 8.0

Los 100 ml de TBS se mantienen en refrigeración durante 30 min. El 4-cloro1-naftol se agrega al metanol que debe estar frío y se mezclan perfectamente (esta mezcla debe hacerse al momento en que se realizará el revelado). La mezcla anterior y el peroxido de hidrógeno se agregan al mismo tiempo pero en diferente sitio cada uno del recipiente que contiene el TBS y se mezcla rápidamente para que se homogenicen todos los componentes. A continuación se introducen las membranas que se van a revelar, se tapa el recipiente y se cubre con papel aluminio para que la reacción se lleve a cabo en la

²⁴ Sigma

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AM	Aglutinación microscópica
ATP	Adenosin trifosfato
ATPasa	Enzima que hidroliza ATP
°C	Grados centígrados
Cl	Cloramfenicol
d’NTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
DO	Densidad óptica
g	gravedades
GLP	Glicoproteína
gsp	General secretion pathway
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
HRP	Peroxidasa de rábano
ICQ	Inmunocitoquímica
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina tipo G
IgM	Inmunoglobulina tipo M
IHQ	Inmunohistoquímica
IPTG	Isopropil- β -tiogalactósido
Ka	Kanamicina
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilodaltones
LB	Luria Bertani
Lip	Lipoproteína
LPS	Lipopolisacárido
mA	Miliamperes
MALs	Marcos abiertos de lectura
ME	Membrana externa

MI	Membrana interna
min	Minutos
ml	Mililitros
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µm	Micrómetros
NaCl	Cloruro de sodio
OmpL1	Porina de la membrana externa de <i>Leptospira</i>
PAGE	Siglas en inglés de polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PME	Proteína de membrana externa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Duodecil sulfato de sodio
seg	Segundos
TA	Temperatura ambiente
T2SS	Sistema de secreción tipo 2