



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**ESTABLECIMIENTO DE UN ENSAYO DE INMUNOPROTECCIÓN
BASADO EN rGspD DE *Leptospira borgpetersenii* (Hardjobovis)
EN HÁMSTERES**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

**P R E S E N T A
MARÍA GUADALUPE NÚÑEZ CARRERA**

TUTOR: ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA

**COMITÉ TUTORAL:
EDMUNDO CALVA MERCADO
ALFREDO SAHAGÚN RUÍZ**

MÉXICO, D. F.

2009



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: Porque he sido más que afortunada con todo lo que me ha dado.

A mis padres: Francisco y Graciela por todo su apoyo, amor y amistad que me han brindado durante toda la vida. Es un privilegio ser su hija.

A mi esposo: Gracias Luis por nuestros años juntos nunca dejare de dar gracias a Dios porque hayamos coincidido en esta vida.

A mi bebe: Luis Francisco solo gracias por existir, eres la mejor parte de mi vida y mi motivo para seguir adelante TE AMO chiquito, esto va por ti.

A mis hermanos: Lau por tu linda amistad y Paco gracias por creer siempre en mi, los admiro mucho.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN 222806) por el apoyo económico otorgado.

A la FMVZ-UNAM, al programa de Maestría en Ciencias de la Producción y Salud Animal por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado con todo el apoyo recibido.

Al Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma por su enseñanza, consejos y por darme la oportunidad de pertenecer a un proyecto tan bonito.

A mi comité tutorial: Dr. Edmundo Calva M. por sus valiosos consejos en cada tutorial, su amabilidad y por darme la oportunidad de observar el trabajo en el IBT. Al Dr. Alfredo Sahagún R. por su disponibilidad, amabilidad y apoyo en esta investigación

A la Dra. Alejandra Ayanegui A. por estar siempre dispuesta a apoyar, por su ayuda constante y sobre todo por su valiosa amistad.

A los miembros del jurado Dr. Juan Antonio Montaraz C. por su amabilidad y observaciones, a la Dra. Susana Elisa Mendoza E. por su disponibilidad, a la Dra. Laura Cobos M. por enseñarme lo más valioso de la educación; la disciplina. Al Dr. Francisco Javier Basurto A. por su amabilidad, consejos, observaciones y por su muy valioso punto de vista.

A Mike por su amistad y su ayuda en la purificación de nuestra preciada proteína.

A la Dra. Cristina Rodríguez por adoptarme desde que llegue al departamento.

A la Dra. Caro Segundo por la amistad que siempre me brindo y siempre estuvo cuando mas la necesitaba.

A mi amigo Germán por su valiosa amistad y por estar conmigo en los momentos más difíciles de mi vida.

A mis amigos y compañeros de maestría: Fabi, Raúl, Andira, Ceci, Liliana, Rosalba, Elena, Raquel, Dr. Iturbe, Dra. Male gracias por compartir conmigo esta y otras etapas.

A Daniel Atilano por su amistad y apoyo.

A los miembros del área de Microbiología Molecular principalmente al Dr. Alfredo Castañeda porque siempre tuvo una respuesta a mis preguntas.

A la MC Roció Villa G. por su amistad y por ser la inspiración de mi superación profesional.

A toda mi familia por su apoyo incondicional

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Agente Etiológico	2
1.1.1 Taxonomía	2
1.1.2 Morfología	3
1.1.3 Características de cultivo	4
1.1.4 Requerimientos nutricionales	4
1.1.5 Hábitat natural	5
1.1.6 Mecanismos de patogenicidad	5
1.1.7 Proteínas de membrana externa (PMEs)	8
1.2 Leptospirosis	11
1.2.1 Breve historia de leptospirosis	11
1.2.2 Epidemiología	12
1.2.3 Patogenia	15
1.2.4 Signos clínicos	16
1.2.5 Diagnóstico	18
1.2.6 Control y prevención	19
1.3 Sistemas de secreción	20
1.3.1 Sistema de secreción tipo II (T2S)	23
1.3.1.1 Transporte a través de la membrana interna	24
1.3.1.2 Transporte a través de membrana externa	25
2 JUSTIFICACIÓN	31
3 HIPÓTESIS	31
4 OBJETIVO GENERAL	32
5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
6 MATERIAL Y MÉTODOS	33
6.1 Purificación de rGspD	33
6.1.1 Detección de las proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	33
6.1.2 Expresión de la proteína rGspD	34
6.1.3 Purificación de la proteína rGspD	37
6.1.4 Cuantificación de la proteína rGspD	39
6.2 Determinación de DL50%	39
6.2.1 Activación de la virulencia de la cepa LOCaS-46 de <i>L. interrogans</i>	40
6.3 Prueba de Potencia	41
6.3.1 Inmunización	41

6.3.2 Activación de la virulencia de la cepa LOCaS 46 de <i>Leptospira interrogans</i>	43
6.3.3 Ensayo de desafío con la cepa LOCaS-46	43
6.3.4 Estudios para diagnóstico de leptospirosis	44
7 RESULTADOS	50
7.1 Purificación de la proteína rGspD.	50
7.1.1 Detección de la proteína recombinante rGspD.	50
7.1.2 Expresión de rGspD	50
7.1.3 Purificación de la proteína rGspD.	50
7.1.4 Cuantificación de la proteína rGspD	51
7.2 Determinación de la DL 50 % en Hámster	51
7.2.1 Activación de la cepa	51
7.2.2 Dosis Letal 50%	52
7.3 Prueba de Potencia	52
7.3.1 Inmunización	52
7.3.2 Activación de la cepa	53
7.3.3 Ensayo de desafío con cepa LOCaS-46 de <i>Leptospira</i>	53
7.3.4 Estudios para diagnóstico de Leptospirosis	57
8 DISCUSIÓN	74
9 CONCLUSIONES	81
10 BIBLIOGRAFÍA	82
11 APÉNDICE 1	90
12 APÉNDICE 2	101

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
Cuadro 1	Serogrupos y serovariedades de leptospiras patógenas y saprófitas.	3
Cuadro 2	Reservorios comunes de serovariedades de <i>Leptospira</i> .	14
Cuadro 3	Descripción de los principales signos y lesiones de leptospirosis en animales domésticos.	17
Cuadro 4	Ventajas y desventajas de las pruebas utilizadas comúnmente para el diagnóstico de leptospirosis.	18
Cuadro 5	Serovariedades utilizadas frecuentemente para elaborar bacterinas.	19
Cuadro 6	Función de las principales proteínas del sistema de secreción tipo 2	27
Cuadro 7	Esquema de inmunización.	42
Cuadro 8	Esquema de desafío.	43
Cuadro 9	Muestras y estudios para diagnóstico de leptospirosis en ensayo de desafío.	45
Cuadro 10	Esquema de desafío (animales muertos y sobrevivientes).	53
Cuadro 11	Resultados Grupo inmunizado con rGspD y desafiado.	54
Cuadro 12	Resultados Grupo no inmunizado y desafiado.	55
Cuadro 13	Resultados Grupo inmunizado con inmunógeno comercial y desafiado.	56
Cuadro 14	Resultados histopatológicos en riñones de hámsteres desafiados	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
Figura 1	Principales sistemas de secreción en bacterias Gram-negativas.	28
Figura 2	Procesamiento de la proteína en la MI.	29
Figura 3	Esquema de cómo las proteínas son dirigidas hacia GspD.	30
Figura 4	Grupos para la determinación de DL50% de la cepa LOCaS 46 de <i>L. interrogans</i> Serovariedad Canicola.	47
Figura 5	Esquema donde se muestra el procedimiento para la activación de la virulencia de la cepa LOCaS-46 de <i>L. interrogans</i> serovariedad Canicola.	48
Figura 6	Esquema del conteo de leptospiras a partir de un tubo de cultivo de <i>Leptospira</i> en medio líquido (EMJH) utilizando la cámara de Petroff Hausser.	49
Figura 7	PCR de colonia.	60
Figura 8	Inmunodetección tipo Wester blot utilizando anticuerpo monoclonal anti-T7-HRP.	61
Figura 9	Bandas mostrando elusiones de rGspD correspondientes a 63 kDa.	62
Figura 10	Comparación de bandas de la proteína purificada rGspD.	63
Figura 11	Inmunodetección tipo Western utilizando anticuerpo anti-GspD de conejo.	64
Figura 12	Signos de leptospirosis.	65
Figura 13	Comparación de orina de un hámster sano y un hámster con leptospirosis.	66
Figura 14	Curva de sobrevivencia en DL50% en hámsteres desafiados con el cultivo virulento de <i>L. interrogans</i> cepa LOCaS 46.	67
Figura 15	Comparación de apariencia macroscópica de un pulmón de hámster sano y un pulmón de hámster que murió por leptospirosis.	68
Figura 16	Lesiones macroscópicas de órganos de hámster muerto por leptospirosis inoculado con la cepa de <i>L. interrogans</i> LOCaS 46.	69
Figura 17	Media de sobrevivencia post desafío con aislado virulento de <i>L. interrogans</i> cepa LOCaS 46 en días por grupo.	70
Figura 18	Porcentaje de cultivo.	71
Figura 19	Porcentaje de lesiones macroscópicas.	72
Figura 20	Porcentaje de lesiones microscópicas.	73

ABREVIATURAS

AM	Aglutinación Microscópica
BCA	Ácido bicinconínico
Cm	Cloramfenicol
Cu	Cobre
DL50%	Dosis Letal 50%
ADN	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
EMJH	Ellinghausen & McCullough modificado por Johnson & Harris
AIF	Adyuvante incompleto de Freund
GSP	General System Pathway
GrILLeP	Grupo de Investigación en <i>Leptospira</i> y Leptospirosis
H	Hámster
Ig	Inmunoglobulina
IMP	Intramuscular profunda
IP	Intra peritoneal
IPTG	Isopropil- β -D-galactósido
Km	Kanamicina
KCl	Cloruro de potasio
KDa	KiloDalton
LB	Luria Bertani
Lip	Lipoproteína
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
ME	Membrana externa
MI	Membrana interna
mA	Mili amperaje
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MPM	Marcador de peso molecular
PBS	Siglas en ingles de (phosphate buffer solution), solución amortiguadora de fosfatos
PMEs	Proteínas de membrana externa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SC	Subcutánea
SDS	Siglas en ingles de (sodium dodecyl sulphate), dodecil sulfonato de sodio
T2S	Siglas en ingles que hacen referencia al sistema de secreción tipo 2
U	Unidades
xg	Por gravedad
μ g	Microgramos
μ l	Microlitro
$^{\circ}$ C	Grados Centígrados

RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa re-emergente y es una zoonosis de mamíferos causada por alguna de las más de 260 serovariedades patógenas de *Leptospira*. Las variaciones en la estructura y composición del lipopolisacárido (LPS), reflejan la diversidad antigénica entre leptospirosas patógenas. La inmunidad conferida por el LPS de *Leptospira* es generalmente serovariedad específica. En contraste con el LPS las proteínas de membrana externa (PMEs) son altamente conservadas entre serovariedades de *Leptospira*. Se han realizados esfuerzos para identificar antígenos protectores para desarrollar una vacuna recombinante que proteja contra varias serovariedades. Este trabajo se enfocó en GspD, la secretina del Sistema de Secreción Tipo 2 (T2S) de *Leptospira*. Un fragmento de 1,539 pb del gen homólogo a *gspD* de *Hardjobovis* fue clonado en el vector de expresión pET28a, el cual fue transformado en la cepa *E. coli* Rosetta BL21 (DE3). La expresión de la proteína GspD recombinante (rGspD) se realizó por inducción con isopropiltio-β-D-galactósido (IPTG) y se purificó mediante electro-elución. En este estudio determinamos la dosis letal 50% (DL50) en hámster, para la cepa patógena LOCaS 46 de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola previamente aislada por el GrILLeP la cual fue inferior a 10 leptospirosas. Tres grupos de hámsteres (n=10) fueron tratados de la siguiente manera: Grupo 1 fue inmunizado en dos ocasiones con 50 µg de rGspD adicionada con adyuvante incompleto de Freund (AIF) en un volumen final de 100 µl en intervalos de 2 semanas; Grupo 2 usado como grupo testigo negativo, fue inoculado con PBS y AIF. Grupo 3 como testigo, fue inmunizado con un inmunógeno comercial. Dos semanas después de la última inmunización, los tres grupos de hámsteres fueron desafiados vía intraperitoneal con 100 DL50% (1,000 leptospirosas). La sobrevivencia en el grupo inmunizado con rGspD fue del 80 %, la del grupo testigo no inmunizado fue del 60%. Es necesaria más investigación para determinar la protección conferida por rGspD en hámsteres desafiados con serovariedades patógenas de *Leptospira*.

Palabras clave: *Leptospira*, GspD, T2S, Inmunoprotección.

ABSTRACT

Leptospirosis is a re-emerging and zoonotic infectious disease of mammalian caused by any of the more than 260 pathogenic serovars of *Leptospira*. The variations in the structure and composition of lipopolysaccharide (LPS), reflects the antigenic diversity among pathogenic leptospires. The immunity conferred by leptospiral LPS is generally serovar specific. In contrast to LPS, leptospiral outer membrane proteins (OMPs) are highly conserved among leptospiral serovars. Efforts have been made to identify antigens suitable to develop a recombinant vaccine against diverse pathogenic serovars. We focused on GspD the Type 2 Secretion System (T2S) secretin of *Leptospira*. A 1,539 bp DNA fragment of the Hardjovovis *gspD* homologue was cloned in the pET28a expression vector and was transformed into the *E. coli* (BL21 DE3) Rosetta strain. The expression of the recombinant protein GspD (rGspD) was achieved by isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) induction and purified by electro elution. We also determined the lethal dose 50% (LD50) to be less than 10 leptospires in hamster for the pathogenic strain LOCaS 46 of *Leptospira interrogans* serovar Canicola previously isolated by the GrILLeP. Three groups of hamsters (n=10): were used: Group 1 was immunized twice with 50 μ g of rGspD additioned with Freund's incomplete adjuvant (FIA) in a final volume of 100 μ l at 2-week intervals; Group 2 as negative control was inoculated with PBS and FIA (Freund's incomplete adjuvant); Group 3 as a control was immunized with a commercial vaccine. Two weeks after the last immunization, three groups of hamsters were challenged intraperitoneally with 100 LD50% (1,000 leptospires). The 80 % of GspD immunized hamsters survived. Survival in hamsters in the control group was 60%. More research is needed to determine the protection conferred by rGspD in hamsters challenged with pathogenic serovars of *Leptospira*.

Key words: *Leptospira*, GspD, T2S, Immunity.

1 INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad que afecta a mamíferos. De los domésticos, perjudica principalmente a los bovinos, cerdos y perros; otras especies como equinos, ovinos y caprinos también son afectadas aunque con frecuencias relativamente menores (Radostits *et al.*, 1999). Tanto en fauna silvestre libre como en cautiverio se ha reportado esta infección, desde colonias de lobos marinos hasta rinocerontes en zoológicos (Farr, 1995). Un aspecto relevante en la leptospirosis es el estado de portador asintomático, que mantienen algunos animales silvestres y domésticos, principalmente los roedores del medio urbano y rural, favoreciendo la persistencia del microorganismo en el ambiente (Levett, 2001; Ko *et al.*, 2009). El agente etiológico de la leptospirosis es una espiroqueta, cuya pared semeja la de las bacterias Gram negativas, el género *Leptospira* incluye más de 260 serovariedades patógenas. Esta diversidad serológica se encuentra relacionada con la variabilidad y estructura antigénica del lipopolisacárido (LPS), la cual es específica para cada serovariedad (Guerreiro *et al.*, 2001, Nascimento *et al.*, 2004). Las vacunas disponibles en medicina veterinaria se basan en leptospirosis completas inactivadas o preparación de membranas de leptospirosis patógenas, este tipo de vacunas confieren respuestas protectoras a través de la inducción de anticuerpos contra el LPS (de la Peña-Moctezuma *et al.*, 1999). Sin embargo, este tipo de vacunas fallan al inducir una protección duradera contra la infección y no confieren protección cruzada contra otras serovariedades no incluidas en dicha preparación.

En las últimas décadas los estudios celulares y moleculares para el desarrollo de vacunas contra leptospirosis se han enfocado en las proteínas de membrana externa (PMEs) de *Leptospira* (Wang *et al.*, 2007). En contraste al LPS las PMEs pueden inducir inmunidad en el desafío contra serovariedades heterólogas ya que son altamente conservadas entre diversos aislados de *Leptospira* lo cual se ha observado de forma experimental en modelos animales para leptospirosis (Sonrier *et al.*, 2000).

GspD_L es una proteína ubicada en la superficie de la membrana externa, conservada entre diferentes serovariedades patógenas de *Leptospira*, expresada durante la infección y perteneciente al T2S; el principal sistema de secreción en bacterias Gram negativas.

1.1 Agente Etiológico

1.1.1 Taxonomía

La leptospirosis es causada por la espiroqueta patógena del género *Leptospira*. Pertenecen al orden Spirochaetales familia Leptospiraceae (Quinn *et al.*, 2002).

La clasificación serológica se basa en la respuesta antigénica al lipopolisacárido (LPS), principal antígeno de superficie. La gran diversidad serológica entre leptospiras se debe a la diferencia en esta estructura, en particular al ordenamiento de los carbohidratos presentes en la misma (Bulach *et al.*, 2002).

Dentro de esta clasificación las leptospiras patógenas se dividen en más de 260 serovariedades, debido a que las serovariedades se relacionan antigénicamente. Por conveniencia, han sido agrupadas en 25 serogrupos (Levett, 2001; Ko *et al.*, 2009) (Cuadro 1). Recientemente una clasificación molecular divide el género *Leptospira* en 15 especies, en base a estudios de homología del ADN así como ensayos de hibridación de ácidos nucleicos.

La reclasificación usa determinantes genéticos que proveen información taxonómica útil; sin embargo, esto es independiente a lo establecido en la clasificación serológica, en la cual se han basado la mayoría de los estudios clínicos y epidemiológicos (Barthi *et al.*, 2003).

Cabe mencionar que mediante la clasificación genética en algunas leptospiras, identificadas originalmente como serológicamente idénticas se han mostrado diferencias genéticas: tal es el caso de los subtipos de la serovariedad Hardjo: Harjobovis (*L. borgpetersenii*) y Hardjoprajtino (*L. interrogans*), ambas son serológicamente idénticas pero pertenecen a especies diferentes (Faine *et al.*, 1999).

**Cuadro 1 Serogrupos y serovariedades de leptospiras patógenas y saprófitas
(Bharti *et al.*, 2003).**

Serogrupo	Serovariedad representativa	Cepa
Australis	Australis	Ballico
Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
Ballum	Castellonis	Castellon 3
Bataviae	Bataviae	Van tinen
Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
Celledoni	Celledoni	Celledoni
Cynopteri	Cynopteri	3522 C
Djasiman	Djasiman	Djasiman
Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
Hurstbridge	Hurstbridge	BUT 6
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
Javanica	Javanica	Veldrat Batavia 46
Louisiana	Louisiana	LSU 1945
Manhao	Lichuan (manhao 4)	Li 130
Mini	Mini	Sari
Panama	Panama	CZ 214 K
Pomona	Pomona	Pomona
Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
Sarmin	Samin	Sarmin
Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
Shermani	Shermani	LT 821
Tarassovi	Tarassovi	Perepelicin

1.1.2 Morfología

El nombre del género *Leptospira* hace alusión a su morfología, del griego *Lepto*= *estrecho* y *espira*= *espiral*. Aunque citoquímicamente son Gram negativas, no se tiñen con las tinciones bacteriológicas convencionales: para su visualización se requiere de microscopia de campo oscuro, microscopia electrónica o bien la impregnación con plata o técnicas de tinción inmunológicas usadas en tejidos (Quinn *et al.*, 2002).

La familia de las espiroquetas son delgadas, móviles, flexibles, unicelulares encontrándose apretadamente enrolladas, las *Leptospiras* son las bacterias más delgadas dentro de esta familia, midiendo de 0.1 a 0.2 μm de diámetro y 5-15 μm de longitud. Con frecuencia uno de los dos extremos del microorganismo se dobla y forma un gancho; estos microorganismos tienen una gran motilidad gracias a la presencia del flagelo periplásmico.

En medio líquido presentan diferentes movimientos, donde tres tipos de movimientos son posibles: movimiento de rotación, progresivo en una dirección y movimiento circular (Brooks *et al.*, 2004).

1.1.3 Características de cultivo

Las leptospiras pueden ser desde aerobias obligadas a microaerofílicas, con un periodo de generación de 6-8 horas. La temperatura de desarrollo óptimo para serovariedades patógenas oscila entre los 29-30° C, afectando su supervivencia temperaturas inferiores a 7° C o superiores a 34° C. El pH óptimo para su desarrollo es ligeramente alcalino de 7.2 a 7.6, un pH inferior a 6 o superior a 8 inhibe su desarrollo (Rance, 2004). Es una bacteria acuática altamente sensible a la desecación, la humedad es un aspecto importante para su persistencia, son también sensibles a los detergentes, medios ácidos y a la presencia de otros microorganismos (Radostits *et al.*, 1999).

1.1.4 Requerimientos nutricionales

La principal fuente tanto de carbono como de energía son los ácidos grasos regularmente de 12-18 carbonos. La energía es liberada por β -oxidación, no pudiendo usar azúcares o aminoácidos como fuente de energía (Brooks *et al.*, 2004). Curiosamente su principal fuente de energía es también tóxica, por esta razón los medios de cultivo utilizados para su aislamiento requieren de un detoxificante para lo cual regularmente se ocupa la albúmina bovina sérica con ácidos grasos en forma de complejos de sorbitol (Tween), una mezcla de glicerol, iones de amonio y vitaminas como cianocobalamina (Vitamina B12), tiamina

(Vitamina B1), hierro, calcio, magnesio (Adler y de la Peña-Moctezuma, 2009). Las leptospiras desarrollan en medios especiales para su cultivo “*in vitro*” como los medios Fletcher, de Stuart y Korthof los cuales son suplementados con 10% de suero de conejo en soluciones de una mezcla de peptonas, vitaminas y electrolitos, pudiendo ser sólidos, semisólidos y líquidos. El medio EMJH (Ellinghausen-Mc-Cullough modificado por Johnson y Harris), es el medio de elección (Faine *et al.*, 1999; Doern, 2000). Los medios de cultivo pueden ser selectivos para leptospiras al adicionar neomicina o 5-Fluoracilo ya que a diferencia de la mayoría de los procariontes, las leptospiras no incorporan pirimidinas exógenas como el 5-fluoruracilo (Birbestein y Zee, 1990). *Leptospira* en medio líquido desarrolla una leve turbidez; en medio semisólido el desarrollo se concentra en un disco llamado zona de Dinger de aproximadamente 0.5 cm correspondiente al nivel de la tensión de oxígeno óptima para estos microorganismos (Rance, 2004).

1.1.5 Hábitat natural

El hábitat natural de leptospiras patógenas es el túbulo renal de animales que funcionan como su reservorio o huésped definitivo. También pueden sobrevivir en estanques, ríos, lodos, generalmente cuando la temperatura ambiental es húmeda, templada y además el pH es neutro o ligeramente alcalino; son destruidas por la desecación, congelación, calor (50° C durante 20 minutos), sales biliares, detergentes, medios ácidos (Birbestein y Zee, 1990; Quinn *et al.*, 2002).

1.1.6 Mecanismos de patogenicidad

Motilidad y adherencia: Como resultado del endoflagelo y la arquitectura celular de las espiroquetas, estas poseen una motilidad única comparada con el resto de las bacterias, sin embargo, no hay pruebas experimentales que comprueben que la motilidad de estos microorganismos en forma de un tirabuzón pueda ser importante para la entrada y diseminación del microorganismo al huésped (Greenberg y Canale, 1977). Las leptospiras se adhieren a las superficies de células de mamíferos, aunque el mecanismo preciso no es

del todo claro. *Leptospira* puede adherirse a la superficie de células epiteliales; sin embargo la adherencia causa poco o ningún daño a la célula: estos estudios se basan en las observaciones de infecciones experimentales a través de microscopia electrónica (Bolin y Prescott, 1999).

Toxinas: Los signos clínicos de leptospirosis incluyendo fiebre, depresión, hemorragias petequiales difusas y neuropatías sugieren un mecanismo tóxico; sin embargo, el papel de estas toxinas potenciales “*in vivo*” no es claro. Las leptospiras pueden producir fosfolipasas las cuales pueden causar daño a los eritrocitos y otras membranas celulares (Lee *et al.*, 2002)

Persistencia a la infección: La persistencia del microorganismo es importante para la enfermedad, en animales que no mueren por leptospirosis aguda. Las leptospiras pueden persistir en pequeños números en ciertos tejidos que son sitios inmunológicamente privilegiados, estos tejidos incluyen los túbulos renales proximales, cerebro, cámara anterior del ojo y tracto genital de bovinos y porcinos. En el riñón el desarrollo continúa exponencialmente alrededor de 21-28 días después de la infección (Faine *et al.*, 1999).

En órganos donde en situaciones normales no circulan anticuerpos, las leptospiras persisten, se multiplican y a partir de aquí pueden eliminarse y transmitirse a otros animales, principalmente por la orina. Las leptospiras en los tejidos son relativamente no inflamatorias por lo que atrae una escasa atención por parte de los fagocitos. Las leptospiras, al igual que otras espiroquetas *in vivo*, regulan la producción de proteínas de membrana externa contribuyendo a la disminución de antígenos disponibles bajo estas circunstancias (Haake *et al.*, 1991).

Una propiedad universal de las espiroquetas patógenas es la habilidad para causar infección crónica, un mecanismo propuesto mediante el cual éstas logran persistir en el huésped, es la evasión de la respuesta inmune disminuyendo la expresión de PMEs (Radolf, 1994).

Evidencias indican que LipL36 se expresa de forma diferencial durante el crecimiento en cultivos de *L. kirschneri*: en la fase logarítmica temprana se expresa en grandes cantidades, pero decrece en la fase logarítmica media. Una interpretación de este dato es que la expresión de LipL36 es regulada hacia abajo durante la fase logarítmica tardía (Haake *et al.*, 1998). Análisis para evaluar la respuesta inmune humoral durante la infección por *L. kirschneri* a LipL36 sugieren que la expresión de esta proteína es regulada hacia abajo (Haake *et al.*, 1998).

Lipopolisacárido (LPS): Es el principal antígeno de superficie de *Leptospira* y pudiera contribuir a la patología asociada con la enfermedad. Presenta una gran similitud al LPS de una típica bacteria Gram negativa sin embargo, es al menos diez veces menos tóxico para animales o células, aun cuando tiene grandes similitudes estructurales, bioquímicas e inmunológicas. El LPS de *Leptospira* puede activar macrófagos y linfocitos B e inducir la producción de anticuerpos serovariedad específicos (Isogai *et al.*, 1990). Al parecer los lípidos del LPS participan en la presentación de hemorragia, los defectos de coagulación, citotoxicidad, agregación de plaquetas, liberación de ATP y de serotonina (Isogai *et al.*, 1990; Faine *et al.*, 1999)

Proteínas Lig: Las proteínas Lig se encuentran en diferentes especies de bacterias y son parecidas a las inmunoglobulinas: fueron originalmente identificadas en *E. coli* y *Y. pseudotuberculosis* (Hamburger *et al.*, 1999). Los genes *lig* son interesantes ya que estudios de patogénesis indican que las proteínas codificadas por los mismos son clave para la virulencia de ciertos microorganismos, ya que son los determinantes involucrados en la interacción huésped-patógeno. Estudios de genomas secuenciados han demostrado que especies patógenas de *Leptospira* contienen *ligA*, *ligB* y *ligC*, los cuales están ausentes en leptospiros no patógenos como *L. biflexa* (Matsunaga *et al.*, 2003). Hay una fuerte evidencia que LigA es expresada durante la infección, sin embargo, varias cepas de leptospiros patógenos no contienen *ligA* lo cual puede indicar que *ligA* y *ligB* son genes redundantes (Croda *et al.*, 2008). Estudios demuestran que los genes *ligB* se encuentran en todas las leptospiros patógenos estudiadas hasta la fecha sugiriendo un importante o quizás

esencial papel en su virulencia (McBride *et al.*, 2008). El papel que juega LigC en la virulencia no es aun claro ya que en algunas serovariedades es un pseudogen (Matsunaga *et al.*, 2003). Cepas virulentas de *L. interrogans* y *L. kirschneri* expresan altos niveles de proteínas Lig en cultivos atenuados (Matsunaga *et al.*, 2003). Se encuentran ubicadas en la superficie de la bacteria (Matsunaga, 2003). Las proteínas Lig median la interacción con múltiples proteínas de la matriz extracelular incluyendo fibronectinas, fibrinogeno y colágeno, varios estudios indican que las proteínas Lig son inmunogenicas en modelos animales de leptospirosis (McBride *et al.*, 2008).

1.1.7 Proteínas de membrana externa (PMEs)

Las leptospiras presentan proteínas transmembranales de baja densidad y las lipoproteínas que al igual que en otras bacterias Gram negativas se encuentran en grandes cantidades, las cuales en su mayoría están conservadas entre las diferentes serovariedades patógenas (Haake y Matsunaga, 2005).

LipL32: En *Leptospira* ha sido referida como la principal PME debido a que es la más abundante en el microorganismo completo. En el perfil de proteínas es la de peso molecular de 32 kDa y es la banda más prominente, previamente denominada Proteína 1 o (Hap1) proteína asociada a hemólisis (Haake *et al.*, 2000). Es la principal PME demostrada en diversos serogrupos, la reactividad cruzada de las PME entre leptospiras confirma el resultado de un análisis comparativo de secuencias de genes que codifican para OmpL1, LipL32 y LipL41 de 38 cepas representativas, pertenecientes a las principales especies patógenas de *Leptospira*: *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai* y *L. weilii*. Las secuencias de aminoácidos de LipL32 en las diferentes especies exhiben una identidad del 99.1%. La secuencia de aminoácidos de LipL41 y OmpL1 fue más variable que la de LipL32; sin embargo son relativamente más conservadas comparadas con PME de otras bacterias patógenas (Haake y Matsunaga, 2005).

En infecciones de tipo experimental de leptospirosis en hámsteres se demostró que en tejido de riñón y suero LipL32 es expresada durante la infección en mamíferos (Haake *et al.*, 2000).

OmpL1: Su denominación se refiere a que fue la primera PME transmembranal identificada: es una porina trimérica. Estudios de ELISA basados en LipL32 y OmpL1 recombinantes indican que en un alto porcentaje de pacientes con leptospirosis hay anticuerpos presentes contra estos dos antígenos (Flannery *et al.*, 2001). La exposición de OmpL1 en la superficie de *Leptospira* ha sido demostrada por técnicas inmunológicas en microscopio electrónico (Haake *et al.*, 1993). Estudios basados en la cristalografía de PME de *E. coli* y el análisis de la secuencia de aminoácidos de OmpL1 predijeron que contenía segmentos transmembranales en una conformación β (Haake *et al.*, 1999).

LipL45: Se cree que es una proteína de 39.8 kDa después de ser removido el péptido señal. Sin embargo, la discrepancia entre la predicción de la masa molecular de la proteína (39.8 kDa) y la aparente masa molecular (45 kDa) es similar a la observada con otras lipoproteínas de espiroquetas, no se descarta la posibilidad de que LipL45 es post-traduccionalmente modificada. LipL45 fue detectada mediante ensayos de inmunohistoquímica en riñones de hámsteres con leptospirosis infectados experimentalmente (Matsunaga *et al.*, 2002).

OmpL1 y LipL41: Son antígenos conservados entre diferentes especies patógenas de *Leptospira* por lo que son candidatos para vacunas, ambas proteínas son expresadas durante la infección experimental (Barnett *et al.*, 1999).

En estudios realizados por Haake *et al.* (1999) las proteínas OmpL1 y LipL41 recombinantes fueron expresadas como proteínas de membrana y se examinó su potencial inmunoprotector solas y en combinación, demostrándose que juntas proveen niveles significantes de protección en hámsteres desafiados con *Leptospira kirschneri*. Estos resultados dieron la primera evidencia de la viabilidad del uso de PMEs como vacunas en la protección contra leptospirosis. La inmunización de hámsteres con fracciones de membrana

de *E. coli* conteniendo una combinación de OmpL1 y LipL41 demostró que provee protección significativa contra el desafío con *L. kirschneri* serovariedad Grippotyphosa. A los 28 días de post inoculación en animales vacunados con ambas proteínas la sobrevivencia fue del 71%, comparado con el grupo control que fue del 25%. Con base en los ensayos histológicos, serológico y microbiológicos, no hubo evidencia de infección en los sobrevivientes vacunados: el efecto protector de inmunización con OmpL1 y LipL41 fue sinérgico (Haake *et al.*, 1999).

LipL36: Es expresada en altos niveles por cultivos de *L. kirschneri* pero no es detectable en riñones de hámsteres infectados con organismos derivados de huéspedes infectados. LipL36 es un antígeno prominente de la membrana externa de cultivos de *L. kirschneri*, su expresión no ha sido detectada en riñones de hámsteres infectados por inmunohistoquímica, indicando que esta proteína se regula hacia abajo *in vivo* (Barnett *et al.*, 1999). LipL36 es una proteína de membrana externa con una masa molecular de 36 kDa. Se ha demostrado que se encuentra anclada a una porción de la membrana interna y se extiende hasta la membrana externa por lo tanto es localizada en el periplasma (Haake *et al.*, 2000).

Esta proteína ha mostrado ser expresada por especies de leptospiros creciendo *in vitro* pero no en huésped (Barnett *et al.*, 1999) disminuyendo su expresión a 37° C y a bajas concentraciones de hierro (Cullen *et al.*, 2002). Basados en los hallazgos, LipL36 puede ser una útil herramienta para estudiar la adaptación de especies patógenas de *Leptospira* en el ambiente del huésped (Haake *et al.*, 1998).

GspD: El GrILLEP ha estudiado algunas de las proteínas que conforman el llamado sistema de secreción tipo II (T2S), en particular la secretina GspD, una proteína ubicada en la superficie de la membrana externa, conservada entre diferentes serovariedades patógenas de *Leptospira*, expresada durante la infección y perteneciente al T2S; el principal sistema de secreción en bacterias Gram negativas (Mena-Bañuelos, 2006; Alcaraz-Sosa, 2008; Rodríguez-Reyes 2008).

1.2 Leptospirosis

1.2.1 Breve historia de leptospirosis

La leptospirosis frecuentemente es relacionada con ictericia, desde la época donde se creía que la medicina sólo se explicaba como fenómenos mágicos o bien fenómenos religiosos.

En épocas muy remotas se consideraba que, cuando el río acarrea plantas amarillas, aparecía la ictericia en cierto lugar (Faine *et al.*, 1999). Los papiros médicos en Egipto hacen alusión a cuadros clínicos que recuerdan a los síntomas de la leptospirosis; sin embargo, la primera descripción en forma detallada de la enfermedad en el hombre fue realizada por el médico alemán Adolf Weil en 1886 entre trabajadores agrícolas alemanes, este trabajo fue completado por Vasilef dos años más tarde. En humanos esta enfermedad es conocida como la enfermedad de Weil causada por las sarovariedades Icterohaemorrhagiae y Copenhageni de *Leptospira interrogans* (Faine *et al.*, 1999; Erosa, 2001).

El agente etiológico de leptospirosis fue observado por vez primera en 1907 por Stimson en el riñón de un paciente diagnosticado con fiebre amarilla a este agente lo nombró "*Spiroqueta interrogans*" por sus terminaciones en forma de gancho (Farrar, 1991). El primer aislamiento en cultivo puro del agente causal de leptospirosis se realizó en 1914 por R. Inada y G. Ido llamándolo "*L. icterohaemorrhagiae*". La primera publicación de su morfología se atribuye a Hideo Noguchi en el año de 1918 en Guayaquil Ecuador, a la cual llamó "*Leptospira icteroides*" dedicándose a describir la estructura de las leptospiras mediante el microscopio óptico y comparándolas tanto microscópicamente como serológicamente con otras espiroquetas (Noguchi, 1920; Faine *et al.*, 1999). En 1919 Noguchi realizó los primeros estudios sobre leptospirosis en Yucatán, México describiendo el primer caso en humanos. En 1921 Pérez Grovas confirmó los estudios del Dr. Noguchi pero en el estado de Veracruz, en 1958 en Yucatán ocurrió el primer brote epidémico en México (Varela y Roch, 1965).

En medicina veterinaria Saiz emplea la prueba de aglutinación microscópica para la detección de la enfermedad en la especie bovina (Saiz, 1962). De 1930 a 1969, Varela y colaboradores realizaron estudios serológicos sobre leptospirosis, en diferentes partes de la República Mexicana involucrando a humanos y algunas especies animales, resultando en humanos las serovariedades más frecuentes Icterohaemorrhagiae, Pomona y Canicola, las zonas más afectadas fueron las del centro y sureste del país. Un aspecto relevante de los estudios de Varela y colaboradores es la importancia de los animales domésticos en la epidemiología de la enfermedad, ya que pueden sustituir al reservorio natural para los humanos tanto en área rural como urbana (Varela *et al.*, 1958). En 1975 la Secretaria de Salud y Asistencia informó que se detectaron muestras positivas en ratas en Veracruz, Tabasco, Península de Yucatán, Tampico y Mazatlán (Erosa, 2001). Sin embargo, estudios realizados en 2002 indican que hay una amplia diversidad de serovariedades presentes en la república son aun las serovariedades mencionadas las que se han mantenido prevalentes (Vado *et al.*, 2002).

Debido a que frecuentemente se descubren nuevas serovariedades de *Leptospira*, la leptospirosis ha tomado diferentes denominaciones, las cuales han sido utilizadas para describir la enfermedad producida por estos microorganismos según sus características epidemiológicas, clínicas, territoriales, especies afectadas o estacionalidad. Sólo por mencionar algunas denominaciones en humanos tenemos: enfermedad de Weil, ictericia espiroquetosica, ictericia infecciosa, ictericia catarral epidémica, fiebre de otoño de Japón, fiebre de los pantanos, gripa de estío, fiebre de las aguas, enfermedad de los arrozales, meningo-tifo esporádico y fiebre amarilla mediterránea. En caninos, fiebre tifoidea de los perros, enfermedad de Stuttgart; en porcinos, enfermedad de las piaras o de las porquerizas (Hagan y Bruner, 1961; Erosa, 2001; Faine *et al.*, 1999).

1.2.2 Epidemiologia

La leptospirosis es considerada como una enfermedad de gran importancia en animales de producción, debido a las pérdidas económicas que ocasiona en diferentes países; como

consecuencia de abortos, nacimiento de animales débiles, mortinatos, infertilidad, agalactia, entre otras; por otro lado, como un riesgo de zoonosis en personas expuestas de manera directa e indirecta a animales infectados o a sus excreciones (Barthi *et al.*, 2003). La leptospirosis es una enfermedad infecciosa y contagiosa, de presentación clínica muy variada, es reconocida como la zoonosis más difundida en el mundo es más frecuente en climas templados y húmedos, aunque se ha encontrado a nivel mundial algunas serovariedades que se limitan a ciertas regiones geográficas (Farrar, 1991; OIE, 2005). Para la persistencia de leptospiras patógenas en la naturaleza es esencial la presencia tanto de animales domésticos como silvestres (Acha y Szyfres, 1986).

La clave principal en la epidemiología de la leptospirosis es la existencia de los animales portadores, en los que *Leptospira* coloniza los túbulos proximales del riñón y los animales diseminan al microorganismo con la orina, provocando infección de manera directa o indirecta a otros animales o al humano (Adler y de la Peña-Moctezuma, 2009). La infección en el humano es accidental, regularmente por el contacto con agua o materiales contaminados con excreciones de animales. En todo el mundo la rata es la fuente más común de infección humana, sin embargo otros roedores, perros, cerdos y bovinos también actúan como fuente de infección al humano y a otros animales. La transmisión de persona a persona es rara (Brooks *et al.*, 2004).

Dos factores epidemiológicos son importantes y dificultan el control efectivo de leptospirosis: el primero, es que el microorganismo puede establecer una relación de reservorio o huésped definitivo con diferentes animales, persistiendo por periodos prolongados en túbulos renales con daño renal moderado; segundo, los animales silvestres (tanto huéspedes accidentales como reservorios) representan un factor importante para la re-infección continua de poblaciones de animales domésticos (Farrar, 1991). Así algunas serovariedades están adaptadas a un huésped de mantenimiento en particular, aunque potencialmente pueden causar enfermedad en cualquier especie de mamíferos. Un animal infectado con una serovariedad adaptada al huésped es un huésped de mantenimiento o

reservorio y la exposición de animales susceptibles a serovariedades no adaptadas al huésped pueden producir una enfermedad accidental o incidental (Radostists *et al.*, 1999).

Las serovariedades se comportan de manera diferente dependiendo si el huésped es de mantenimiento o accidental. Un huésped de mantenimiento se caracteriza por: alta incidencia a la infección (30-50%), transmisión endémica a la especie del huésped, tendencia a sufrir una enfermedad crónica y subclínica (en lugar de aguda y clínica), persistencia de la serovariedad en los riñones principalmente, respuesta de anticuerpos baja en la prueba de aglutinación microscópica, eficacia baja de la vacunación (Cuadro 2). En contraste, un huésped accidental se caracteriza por una incidencia relativamente baja para la infección, pero con patogenicidad alta para el huésped, tendencia a sufrir una enfermedad aguda (en lugar de crónica), transmisión esporádica en la especie del huésped y adquisición de la infección de otra especie, fase renal corta, respuesta de anticuerpos intensa y finalmente las vacunas resultan más eficaces para prevenir la infección (Bolin y Prescott, 1999).

En humanos hay una asociación ocupacional con la incidencia de leptospirosis en grupos que se encuentran expuestos al agente, tales como los trabajadores de arrozales, cañaverales, minas, alcantarillados, mataderos, cuidadores de animales y médicos veterinarios (Acha y Szyfres, 1986).

Cuadro 2 Reservorios comunes de serovariedades de *Leptospira* (Barthi, 2003)

Reservorio	Serovariedades comúnmente aisladas
Porcinos	Pomona, Tarassovi
Bovinos	Hardjobovis, Hardjoprajitno, Pomona
Equinos	Bratislava
Caninos	Canicola
Ratas y ratones	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Ballum, Arborea y Bim

1.2.3 Patogenia

La patogenia de leptospirosis está relacionada con la serovariedad y con la susceptibilidad del huésped; tanto en huéspedes accidentales como en huéspedes de mantenimiento la patogenia es similar. El microorganismo penetra a través de las membranas mucosas de la boca, conjuntiva, tracto genital o a través de pequeñas abrasiones de la piel reblandecida por agua; sin embargo, resulta poco probable que el microorganismo penetre por piel intacta. Las infecciones fetales ocurren por la invasión directa de la placenta de la madre al feto en algunas etapas de la gestación (Faine *et al.*, 1999). Después de un periodo variable de incubación (4-20 días), las leptospiras circulan en la sangre por aproximadamente 7 días. Durante este periodo las leptospiras se replican en los tejidos, colonizando principalmente hígado, riñón, pulmón, tracto genital y sistema nervioso central. Otros tejidos y órganos comúnmente afectados incluyen músculo, ojos y meninges donde producen daños degenerativos, la vasculitis es la lesión primaria (Radostits *et al.*, 1999).

Después de 10 días de iniciada la infección, se presentan anticuerpos séricos. Posterior al desarrollo de anticuerpos, las leptospiras pueden permanecer en los túbulos renales de huéspedes accidentales sólo por periodos cortos y diseminarse por la orina por pocos días o varias semanas. En contraste con los huéspedes de mantenimiento en los cuales el microorganismo permanece por meses o años, principalmente en túbulos renales, tracto genital y en menor proporción el sistema nervioso central y ojo. La localización y persistencia de *Leptospira* en hembras gestantes puede resultar en infección fetal con subsecuente aborto, mortinatos o neonatos débiles (Bolin y Prescott, 1999; Faine *et al.*, 1999).

Las lesiones de leptospirosis incluyen daño a los endotelios que conducen al escape de eritrocitos y plasma a los tejidos, para dar origen a una hipoxia secundaria. Aun no es claro como *Leptospira* produce lesión y enfermedad: varios mecanismos de patogenicidad han sido propuestos como importantes para el desarrollo de la leptospirosis, incluyendo motilidad y adhesión, toxinas bacterianas (fosfolipasas), persistencia de la infección con daño a los tejidos mediado por la respuesta inmune (Bolin y Prescott, 1999).

1.2.4 Signos clínicos

El humano es susceptible a diferentes serovariedades de *Leptospira*, el periodo de incubación es regularmente de 1-2 semanas. Las manifestaciones clínicas son variadas con diferente grado de severidad, la mayoría de las infecciones ocurre de forma inaparente o subclínica. Si su presentación es de manera clínica se puede presentar en dos tipos: icterico y anictérico. En pacientes con leptospirosis un 90% tiene la forma anictérica y un 5-10% presentan la forma icterica (Farrar, 1991).

La descripción clásica de leptospirosis icterica en humanos corresponde a la llamada enfermedad de Weil, en la cual los signos se presentan de forma brusca como una enfermedad febril aguda caracterizada por dolor de cabeza, rigidez del cuello, mialgias, diarreas, constipación, la postración puede ser marcada y comúnmente se presentan petequias en la piel (Acha y Szyfres, 1986).

Regularmente los pacientes gravemente ictericos presentan insuficiencia renal, hemorragias y colapso cardiovascular; la orina es habitualmente anormal se presenta proteinuria y hematuria (Farrar, 1991).

En animales los signos son también altamente variables y pueden tener una presentación aguda o crónica y cuando se presenta en forma subclínica representan un riesgo de salud pública.

La mayoría de las infecciones por *Leptospira* tienen un curso asintomático, las formas clínicas son raramente observadas. Las infecciones clínicas se presentan principalmente en perros, bovinos y cerdos, y en ocasiones en caballo, cabras, ovinos, excepcionalmente se presenta en gatos (Biberstein y Zee, 1990) (Cuadro 3).

Cuadro 3 Descripción de los principales signos y lesiones de leptospirosis en animales domésticos

Huésped	Signos clínicos y lesiones
Bovinos	Puede provocar enfermedad de curso agudo, subagudo o crónico. La leptospirosis aguda afecta principalmente a terneros presentando signos de fiebre, septicemia, anorexia, apatía, hemoglobinuria, ictericia, anemia, taquicardia, disnea (Pomona, Canicola, Gryppotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Ballum). En adultos la leptospirosis regularmente es subclínica, la forma aguda es caracterizada por una marcada disminución de la producción láctea, presentándose mastitis (Hardjobovis, Hardjoprajitno). Regularmente el síntoma relevante de leptospirosis en la presentación aguda, subaguda en esta especie es la presencia de abortos en cualquier etapa de la gestación (Acha y Szyfres, 1986; Bibertein y Zee, 1990; Radostits <i>et al.</i> , 1999).
Porcinos	La leptospirosis crónica es la más común en esta especie caracterizada por abortos y una incidencia alta de mortinatos (Pomona, Tarassovi, Bratislava). La leptospirosis aguda en cerdos resulta una enfermedad fatal, con reacciones febriles, ictericia, hemoglobinuria, convulsiones y trastornos gastrointestinales, se ha encontrado en algunos animales meningitis y signología nerviosa (Canicola, Icterohaemorrhagiae, Copenhageni) (Acha y Szyfres, 1986; Quinn <i>et al.</i> , 2002).
Caninos	La infección puede variar desde una forma asintomática siendo la más común (Canicola), hasta presentar signos graves; en la forma hemorrágica se presenta rigidez, mialgias, úlceras en membranas mucosas y piel, manifestada por epistaxis, melena y vomito (Pomona, Gryppotyphosa, Icterohaemorrhagiae). La forma aguda afecta a cachorros jóvenes, produciendo fiebre sin signos aparentes y normalmente es mortal en corto tiempo. En la forma icterica son afectados individuos adultos con mialgias, astenia, deshidratación, emesis y disfunción renal. En la forma urémica, se encuentra asociada con extenso daño renal, regularmente se observa estomatitis ulcerativa y halitosis (Birbestein y Zee, 1990; Rance, 2004).
Gatos	Los gatos muy rara vez sufren de leptospirosis clínica, sin embargo, si han sido reportadas infecciones con presentación clínica, tales casos se asocian a animales con estado inmunodeficiente (Quinn <i>et al.</i> , 2002).
Equinos	Los equinos raramente presentan la enfermedad clínica, pero pueden presentar un cuadro clínico similar al del ganado, con mortinatos y aborto (Pomona). El principal signo característico de leptospirosis crónica en caballos es una forma de uveítis recurrente llamada "oftalmia periódica" (Bratislava, Pomona) (Quinn <i>et al.</i> , 2002).
Ovinos y Caprinos	En los pequeños rumiantes la leptospirosis es parecida a la que se observa en los bovinos, sin embargo la presentación clínica es de menor frecuencia en estas especies (Hardjobovis, Pomona, Gryppotyphosa) (Birbestein y Zee, 1990).
Roedores	Los roedores silvestres no manifiestan signos o lesiones actuando como los principales acarreadores de la enfermedad (Ballum, Australis, Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Autumnalis, Bataviae). Sin embargo en el estudio de leptospirosis de forma experimental, el hámster ha mostrando signos de pérdida de peso, pelo hirsuto, postración, nefritis intersticial, neumonía hemorrágica, hepatitis (Pomona, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Gryppotyphosa) (Faine <i>et al.</i> , 1999; Quinn <i>et al.</i> , 2002).

1.2.5 Diagnóstico

Al ser los signos de leptospirosis tan variables, la enfermedad resulta de difícil diagnóstico clínico. Regularmente el diagnóstico de laboratorio se vuelve necesario para su confirmación: muestras de sangre, orina y tejidos de fetos abortados son útiles para el aislamiento del microorganismo. Sin embargo, las técnicas más comúnmente usadas para el diagnóstico son serológicas y en menor grado microbiológicas y moleculares (Cuadro 4) (León, 2005).

Cuadro 4 Ventajas y desventajas de las pruebas utilizadas comúnmente para el diagnóstico de leptospirosis (WHO y ILS, 2003)		
PRUEBA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Cultivo	Prueba diagnóstica definitiva para demostración de leptospirosis	No contribuye a un diagnóstico rápido y temprano de la enfermedad. Costo elevado, muy lento y de baja sensibilidad.
Aglutinación Microscópica (AM)	Alta especificidad	Mantener paneles de leptospiras vivas, potencial riesgo biológico. Técnica laboriosa principalmente cuando el panel es largo. Los anticuerpos pueden no ser detectados cuando la cepa causante no se encuentra presente o al inicio de la enfermedad.
Campo oscuro	De gran utilidad para observar leptospiras en cultivo o en la prueba de AM.	El reconocimiento de leptospiras es difícil particularmente cuando hay poca cantidad o a la presencia de artefactos por ejemplo fibrina en sangre puede ser confundida con leptospiras. Los resultados de campo oscuro siempre requieren de otra prueba confirmatoria.
ELISA	Detecta anticuerpos clase IgM en fases tempranas de la enfermedad, pudiendo ser indicativo de infección reciente, en contraste con AM esta prueba si puede ser estandarizada.	Son menos específicas que AM. Puede haber reacción cruzada con otras enfermedades. Regularmente los resultados de ELISA deben ser confirmados por AM.
PCR	Puede ser una prueba de diagnóstico rápida en fases tempranas de la enfermedad.	Requiere equipo especial de laboratorio. Puede arrojar falsos positivos en la presencia de DNA contaminante. La validación de la PCR puede arrojar falsos negativos en la presencia de inhibidores, depende esencialmente de los controles incluidos en la prueba.
Inmunohistoquímica	Se puede observar al microorganismo de manera directa.	Se puede confundir con otros artefactos. Requiere de personal calificado.

Las técnicas serológicas nos dan un acercamiento para el diagnóstico valorando la respuesta inmune del individuo que ha sido expuesto al microorganismo, la prueba de referencia mundial y la más utilizada es la Aglutinación Microscópica (AM) (Myers, 1985).

1.2.6 Control y prevención

Generalmente el método de control en los bovinos, porcinos y caninos, ha sido la inmunización con bacterinas que contengan organismos completos de serovariedades patógenas, utilizando biológicos con serovariedades presentes en cierta región. La inmunidad de un animal hacia una serovariedad en particular, no la protege necesariamente de la infección por otra (Radostits *et al.*, 1999). En México se cuenta con bacterinas de 2 y hasta 12 serovariedades. Los programas de vacunación y control de leptospirosis se orientan a la especie bovina de cualquier raza y función zootécnica, a caninos y porcinos (Cuadro 5). Las bacterinas que se utilizan son suspensiones de una o más serovariedades, cuya presencia se ha demostrado en México por métodos serológicos y prácticamente no por aislamiento e identificación. Tales suspensiones son inactivadas de forma tal, que conserven sus características inmunogénicas; estos productos pueden contener algún conservador (NOM-038-ZOO-1995).

Cuadro 5 Serovariedades utilizadas frecuentemente para elaborar bacterinas	
Especie	Serovariedad
Bovino	Wolffi, Hardjo, Bratislava y Grippytyphosa
Cerdo	Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippytyphosa, Hardjo y Pomona
Canino	Canicola e Icterohaemorrhagiae

La producción de anticuerpos estimulados por bacterinas tradicionales está dirigida hacia el LPS en la membrana externa. Los anticuerpos contra el LPS de *Leptospira* son considerados protectivos en ciertas especies animales; sin embargo, la protección que genera es serovariedad específica y de corta duración (Haake y Matsunaga, 2005).

En contraste al LPS se cree que las PMEs son altamente conservadas. Por esta razón hay un intenso interés en dichas proteínas para desarrollar vacunas efectivas para la protección de individuos en riesgo así como una prueba serodiagnóstica precisa (Haake y Matsunaga, 2005).

En la evaluación de la capacidad inmunoprotectora de PMEs de *Leptospira*, un aspecto potencialmente importante de inmunogenicidad es la asociación que tienen estas proteínas con la membrana externa de la bacteria. Las PMEs que se encuentran expuestas en la superficie de *Leptospira* están potencialmente involucradas en la patogenia debido a su localización entre el microorganismo y el huésped. Actualmente el enfoque de la investigación en *Leptospira* ha sido identificar proteínas que sean relevantes en la patogénesis de este microorganismo y la inmunidad del huésped. Hasta la fecha el método más directo disponible para evaluar la relevancia de algunas proteínas en la patogénesis de *Leptospira*, ha sido determinar si la inmunización con determinada proteína es capaz de alterar el proceso de enfermedad en un modelo animal (Haake *et al.*, 1999).

1.3 Sistemas de secreción

Los sistemas de secreción son un conjunto de estructuras moleculares que le permiten a una proteína sintetizada en el citoplasma salir al espacio extracelular por medio de tres procesos, 1-Translocación; que se refiere al transporte de una proteína a través de membranas biológicas, 2-Secreción es el transporte de una proteína desde el interior hacia el exterior de la célula y 3-Exportación que define el transporte de una proteína desde el citoplasma hacia el periplasma de bacterias Gram negativas (Desvaux *et al.*, 2004). La secreción de proteínas es requerida para muchos procesos del ciclo de vida de las bacterias, incluyendo biogénesis de organelos, adquisición de nutrientes y expresión de factores de virulencia (Thanassi y Hultgren, 2000). La secreción extracelular de proteínas es considerada como el principal mecanismo de virulencia en las infecciones bacterianas, resultados obtenidos desde hace más de dos décadas han clarificado la visión de la secreción de proteínas en bacterias Gram negativas, demostrando que la membrana externa no es inerte con respecto a tales moléculas, sin embargo, hasta el momento no se

comprende porque ciertas proteínas son secretadas por una vía y no por otra. En bacterias Gram negativas seis vías de secreción han sido identificadas hasta la fecha (Sandkvist, 2001). Cuatro de estas vías representan a los sistemas que portan la secuencia señal que requiere del Sistema Sec para la translocación de la proteína desde la membrana interna hasta el espacio extracelular de la bacteria (Thanassi y Hultgren, 2000). El sistema chaperona/ usher es considerado como minoritario. (Figura 1).

Recientes estudios funcionales indican que los sistemas de secreción pueden promover la virulencia en bacterias patógenas de humanos, animales y plantas la secreción de proteínas al medio extracelular las cuales tienen funciones de: toxinas, adhesinas, enzimas hidrolíticas, lipasas, así como ser de utilidad para la fisiología de varias bacterias ambientales: biogénesis de organelos, adquisición de nutrientes y expresión de factores de virulencia (González y Dreyfus, 2003).

Sistema de secreción tipo I: Este sistema realiza la secreción de toxinas, proteasas y lipasas principalmente, es regularmente ejemplificado por la secreción de HylA en *E. coli* (Thanassi y Hultgren, 2000). Es una vía Sec-independiente (Figura 1), ya que la secreción es en un sólo paso, la proteína a ser excretada presenta una señal de secreción en su extremo carboxilo la cual no se procesa (Sapriel *et al.*, 2003). Se encuentra constituido por 3 componentes: PME (Proteína de membrana externa) canal en la membrana, Transportador ABC (ATP Binding cassette) y la Proteína de Fusión (PF) (Letoffe *et al.*, 1996).

Sistema de secreción tipo III: Este sistema de secreción es de estructura proteica compleja va desde la membrana externa hasta la membrana interna, también es una vía Sec-independiente (Figura 1), teniendo un papel central en la patogenicidad de diversos microorganismos, tiene una maquinaria conservada entre diferentes bacterias patógenas así el mismo mecanismo de transporte puede generar una amplia gama de enfermedades. El ejemplo prototipo es la secreción de proteínas efectoras denominadas Yops (*Yersinia*) (Buttner y Bonas, 2002). Una de las principales características de este sistema, es que requiere de más de 20 proteínas que atraviesan la membrana bacteriana y eucarionte, por

actuar como una jeringa este aparato ha sido denominado inyectisoma (Desvaux *et al.*, 2004).

Sistema de secreción tipo IV: En este sistema, dependiendo de la proteína a ser secretada puede ser una vía Sec- independiente o ser una vía Sec-dependiente (Figura 1) (Desvaux *et al.*, 2004). Es un sistema de transporte versátil que regularmente es relacionado con la transferencia conjugativa de ácidos nucleicos, sin embargo, es un sistema que transporta tres tipos de sustratos: intermediarios de la conjugación de DNA, sistema implicado en la secreción de las subunidades de la toxina de *Bordetella pertussis* es un sistema de 12 componentes denominados VirB1 a B-11 y VirD4. Dentro del Sistema VirB existen componentes asociados a la MI: ATPasa formando canales y proteínas monoméricas incluyendo primasas y RecA, entre otras (Christie y Vogel, 2000). Recientemente, este sistema ha sido dividido en dos subclases tipo IVa: que corresponden a los que contienen homólogos de VirB en *Agrobacterium tumefaciens* y tipo IVb correspondientes a los sistemas homólogos de un plásmido de *Shigella flexneri* (Incl Collb-P9) (Burns, 2003).

Sistema de secreción tipo V o Autotransportadores: En cuanto a la terminología de la clasificación este sistema se conoce como vía de secreción tipo V sin embargo, se concluyó que el nombre de autotransportador es el que mejor describe al sistema (González y Dreyfus, 2003). Los autotransportadores (Figura 1), ayudan en la exportación de proteasas, toxinas, adhesinas e invasinas. Es una vía Sec-dependiente, no requieren factores adicionales ya que dirigen su propia exportación. El extremo carboxilo terminal dirige la secreción de la región amino terminal a través de la membrana externa, el prototipo de este sistema es la secreción de la proteasa IgA1 de *Neisseria gonorrhoeae*. Donde la proteína a secretarse presenta 3 regiones funcionales: la secuencia señal amino terminal, el dominio pasajero y dominio β carboxilo-terminal (Henderson y Nataro, 2001).

Vía chaperona/usher: Es un proceso conservado para ensamblar fimbrias en la superficie de las bacterias Gram negativas e involucra a una proteína de membrana externa denominada usher, una chaperona periplasmica y una subunidad de fimbria (Sauer *et al.*,

2004). Esta vía secreta estructuras de virulencia como fimbrias P y tipo 1 en *E. coli* uropatógena. El ensamble de las estructuras de la fimbria por la vía chaperona/usher frecuentemente ha sido reportada jugando un rol importante en la patogénesis bacteriana, facilitando la unión al tejido del huésped y la formación de biofilms (Hull *et al.*, 1981).

Las subunidades de la fimbria son exportadas individualmente a través de la membrana interna por el sistema Sec y la región amino terminal de la secuencia señal es procesada (Figura 1).

En el periplasma cada subunidad se une a proteínas chaperonas en forma de complejos solubles, el complejo chaperona-subunidad migra a la proteína usher que se encuentra en la membrana externa y forma un canal. La chaperona se une a usher y le transfiere la subunidad. Las chaperonas juegan un rol crítico en el ensamblado, estabilización y captación de las subunidades antes de la polimerización en una fimbria (Ruer *et al.*, 2007).

1.3.1 Sistema de secreción tipo II (T2S)

Es el principal sistema de secreción de proteínas sintetizadas en el citoplasma bacteriano que incluyen proteínas como proteasas, pectinasas, enzimas hidrolíticas y toxinas, al medio extracelular. Un análisis a partir de diferentes genomas secuenciados, ha revelado que genes del T2S son comunes, pero de ninguna manera universales en bacterias Gram negativas (Cianciotto, 2005). La vía de secreción tipo 2 regularmente es ejemplificada por la pululanasa de *Klebsiella oxitoca* (Pugsley *et al.*, 1997). Bacterias como *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Aeromonas*, han sido modelos de estudio para entender el funcionamiento de los diferentes componentes del T2S, así como el proceso de secreción en su conjunto. Es claro que los componentes del T2S muestran una relación evolutiva con el aparato que participa en la síntesis del pili tipo IV (Filloux, 2004).

El T2S es una vía Sec-dependiente (Figura 1) en donde la secreción de proteínas, que requieren este sistema portan un péptido señal, que es generalmente una secuencia corta de aproximadamente 30 aminoácidos (Driessen, 2001)

La secreción de proteínas sintetizadas en el citoplasma que son transportadas hasta el espacio extracelular, es un proceso que sucede en dos pasos el cual involucra a un poro de

translocación en la membrana interna y un complejo sistema de proteínas ubicado principalmente en el periplasma y membrana externa (Stathopoulos *et al.*, 2000)

1.3.1.1 Transporte a través de la membrana interna

Muchas proteínas extracelulares, del periplasma y de la membrana interna de bacterias Gram negativas son sintetizadas en el citoplasma como proteínas precursoras que tienen un péptido señal y que son exportadas hacia el periplasma con ayuda de la traslocasa Sec (Economou, 1998). El poro de translocación de *E. coli* consiste en una proteína chaperona específica denominada SecB junto con una proteína ATPasa llamada SecA, y un complejo proteico integral de membrana conformado por seis diferentes subunidades (Figura 2) denominadas (SecY, SecE, SecD, SecF, SecG y YajC) (Stathopoulos *et al.*, 2000).

Estudios *in vivo* demuestran que sólo SecY y SecE son realmente esenciales para el proceso de translocación, las otras subunidades sólo son requeridas a bajas temperaturas (Danese y Silhavy, 1998). La chaperona SecB mantiene a la preproteína en un estado competente de secreción, funcionando también como un blanco para SecA, la translocación de la proteína precursora se inicia por la unión de ATP a SecA lo cual promueve la inserción del péptido señal y parte de la preproteína al poro de translocación constituido por SecY, E y G (Dong y Wickner, 1998). La hidrólisis de ATP libera a SecA de la proteína translocada parcialmente, la translocación intermedia es dirigida por una fuerza protón motriz (FPM), lo cual también promueve la liberación de SecA; el ATP y la FPM sirven como fuente de energía para diferentes etapas en el proceso de translocación, el ATP es esencial para la secreción a través de la membrana interna, la FPM sólo es requerida en algunas etapas de translocación (Economou, 1998).

Después de la translocación a través de membrana interna el péptido señal es cortado por peptidasas específicas unidas a la membrana, hay tres tipos de peptidasas y cada tipo tiene un sustrato específico diferente, una característica única de este tipo de peptidasas es que sólo corta la secuencia señal en la membrana interna (Stathopoulos *et al.*, 2000).

Después del proceso proteolítico del péptido señal por una peptidasa específica, la preproteína es usualmente liberada en el periplasma, la estabilidad de la proteína en el periplasma es extremadamente importante, aquí las proteínas sufren modificaciones como

la formación de puentes disulfuro o la oligomerización adquiriendo su conformación nativa (Stathopoulos *et al.*, 2000).

1.3.1.2 Transporte a través de membrana externa

El segundo paso es la secreción que es definida como un proceso en que la proteína cruza la membrana externa hacia el espacio extracelular (Thanassi y Hultgren, 2000). Este proceso se lleva a cabo mediante el complejo multiproteico denominado Secretón; con base en los estudios en diversos grupos de bacterias Gram negativas se han identificado genes esenciales para la secreción de proteínas a través del T2S que va de 12 a 15 genes (Johnson *et al.*, 2006).

La mayor parte de las proteínas del T2S se localizan entre la membrana interna y el periplasma, sólo GspD y GspS son las únicas proteínas de este sistema expuestas en la superficie de la membrana externa, sin embargo, aún no existe evidencia concluyente sobre la interacción de ambas proteínas (Bitter *et al.*, 1998).

Estudios bioquímicos y por microscopía electrónica han mostrado que GspD en *Ps.aeruginosa* adopta una estructura con una larga cavidad central de aproximadamente 60 Å, pero puede tener un diámetro suficientemente amplio como 95 Å (Bitter *et al.*, 1998; Bitter, 2003), para transportar polipéptidos plegados. Está conservada entre los diferentes sistemas T2S y existen secretinas homólogas, son componentes del sistema de secreción tipo 3 y del sistema de biogénesis de pili tipo IV, que es una estructura filamentosa de adhesión, presente en muchas bacterias patógenas y que también participa en la movilidad independiente de flagelo que se da sobre superficies sólidas. La secretina PulD en *Klebsiella* ha sido caracterizada mostrándose como un complejo con la lipoproteína PulS (Nouwen *et al.*, 2000; Filloux, 2004).

En géneros bacterianos como *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Idiomarina*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Methylococcus*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Vibrio*, *Xanthomonas*, *Xylela* y *Yersinia*, se ha demostrado la presencia del T2S, las principales proteínas del secretón que han sido identificadas como importantes para establecer un complejo multiproteico funcional son CDEFGHIJKLMO (Cianciotto, 2005) (Figura 3). Los diferentes componentes de este sistema posiblemente juegan papeles

importantes para la secreción de proteínas relevantes para diferentes procesos fisiológicos, estructurales y patogénicos en diversas bacterias (Cuadro 6).

Un T2S de 14 a 17 proteínas ha sido detectado en *Leptospira* y GspD es la única proteína del T2S que se encuentra sobre la membrana externa la cual se ha demostrado es antigénica (Ren *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 2004). En las bacterias Gram negativas, se ha observado que GspD se encuentra localizada sobre la superficie de la membrana externa como un dodecámero que forma un poro a través de la cual son secretadas hacia el exterior las proteínas ya plegadas en el periplasma (Thanassi y Hultgren, 2000; Johnson *et al.*, 2006).

Debido a su localización sobre la superficie de las leptospiras, GspD es antigénica, se ha demostrado la presencia de anticuerpos IgG contra esa proteína en el suero de animales infectados en forma natural o experimentalmente (Alcaraz-Sosa, 2008). Esto sugiere que GspD además es expresada durante la infección (Alcaraz-Sosa, 2008). Por otro lado, el suero hiperinmune de conejo anti-GspD recombinante ha detectado la presencia de GspD en preparados de proteínas totales y extractos de membranas externas de diferentes serovariedades patógenas de *Leptospira* mostrando ser un antígeno conservado (Mena-Bañuelos, 2006; Alcaraz-Sosa, 2008; Rodríguez-Reyes, 2008). Se ha identificado y obtenido la secuencia de *gspD* en la serovariedad apatógena Patoc de *L. biflexa* encontrando una identidad del 64% con su homólogo en *L. interrogans* serovariedad Copenhageni (Mena-Bañuelos, 2006). Debido a que la secretina funciona como la principal vía de secreción bacteriana y es antigénica, se planteo la hipótesis donde GspD podría inducir inmunidad en hámsteres contra el desafío con cepas virulentas de *Leptospira*. La presencia del locus *gsp* tanto en especies patógenas como en no patógenas del género *Leptospira*, podría ser indicativo de la funcionalidad del sistema, tanto para la secreción de proteínas con actividad biológica productora de daño en tejidos específicos del huésped, como para la secreción de enzimas con actividad metabólica.

Cuadro 6 Función de las principales proteínas del T2S

Proteína	Ubicación	Función
GspD	Membrana externa	Es generalmente denominada secretina, se inserta en la ME, la comparación de secuencias en diferentes microorganismos ha demostrado que el dominio C-terminal es altamente conservado y que el dominio N-terminal es variable (Nouwen <i>et al.</i> , 2000). GspD es una proteína multimérica que consiste en 12-15 subunidades, en la mayoría de los casos son extremadamente estables al calor y resistentes a los detergentes (Bitter <i>et al.</i> , 1998). La multimerización hace posible la formación de un anillo similar a un poro, las secretinas han sido comparadas con porinas, sin embargo la presencia de un poro tan grande en la ME puede conducir a la célula a la muerte, así esta estructura se puede abrir y cerrar de una manera controlada (Filloux, 2004).
GspE	Membrana interna	Se encuentra asociada a GspL y GspM. GspE pertenece a la larga familia de nucleosidos trifosfato, los cuales energizan procesos de secreción a través de hidrólisis de NTP (Planet <i>et al.</i> , 2001). Todas las proteínas GspE tienen sitios típicos de unión a ATP llamadas cajas de Walker, comúnmente se presentan en ATPasas, sintetasas y kinasas (Johnson <i>et al.</i> , 2006).
GspG	Membrana interna y periplasma	Forma la pseudopilina principal, las otras subunidades que incluyen GspH, I, J, K, forman las pseudopilinas menores y son similares a las subunidades que conforman el pili del sistema de secreción tipo IV, por esta notable similitud las proteínas pertenecientes al T2S que forman esta unidad han sido llamadas pseudopilinas (Kohler <i>et al.</i> , 2004).
GspL	Membrana interna y periplasma	La interacción que tiene con GspE y GspM resulta en una mutua protección contra la proteólisis tanto de GspL como de GspM (Michel <i>et al.</i> , 1998). Actúa indirectamente en la hidrólisis de ATP a través de la interacción con GspE (Johnson <i>et al.</i> , 2006).
GspM	Membrana interna y periplasma	Logra la estabilización y protección de GspL (Michel <i>et al.</i> , 1998).
GspO	Membrana Interna	Corta la secuencia líder de la preproteína ubicada en la región amino terminal (Filloux, 2004)
GspS	Membrana externa	Es una lipoproteína periférica de la membrana externa, que actúa como chaperona para GspD, contribuyendo a su correcto plegamiento y actividad, la interacción de GspS con GspD cumple dos funciones: es esencial para la inserción de GspD a la ME y protege a la secretina contra degradación proteolítica (Filloux, 2004)

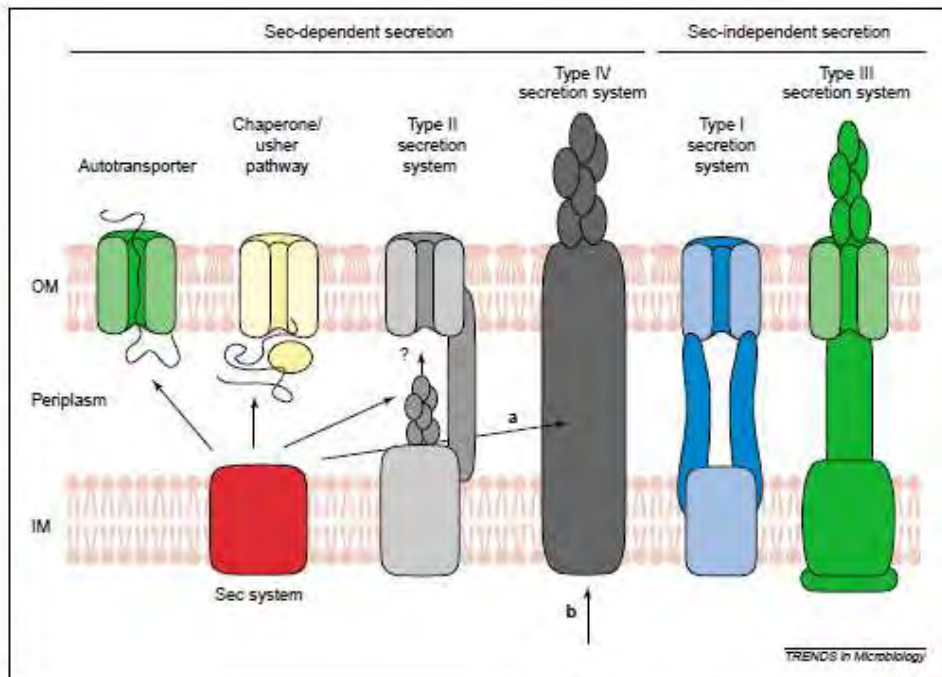


Figura 1 Principales sistemas de secreción en bacterias Gram-negativas. En la figura se muestran las cinco principales vías de secreción además del sistema chaperona/usher, el cual es considerado minoritario, mostrando que cuatro de estos sistemas son dependientes del sistema Sec, mientras que el sistema de secreción tipo I y el tipo III son Sec independientes. Tomado de (Buttner y Bonas, 2002).

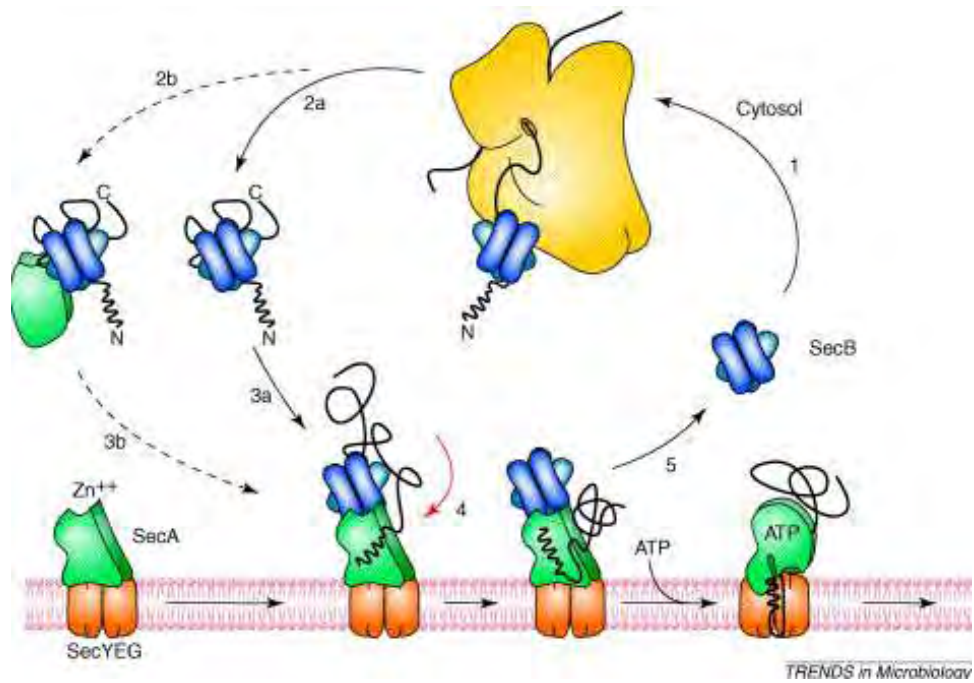


Figura 2 Procesamiento de la proteína en la MI. Se muestran 2 posibles mecanismos de cómo la proteína naciente se une a SecB estabilizando su conformación desplegada, ambos mecanismos conducen a la preproteína a ponerse en contacto con el sistema Sec YEG para la translocación a través de la MI. La unión de ATP por SecA promueve el inicio de translocación y la liberación de SecB. Tomado de: (Driessen, 2001).

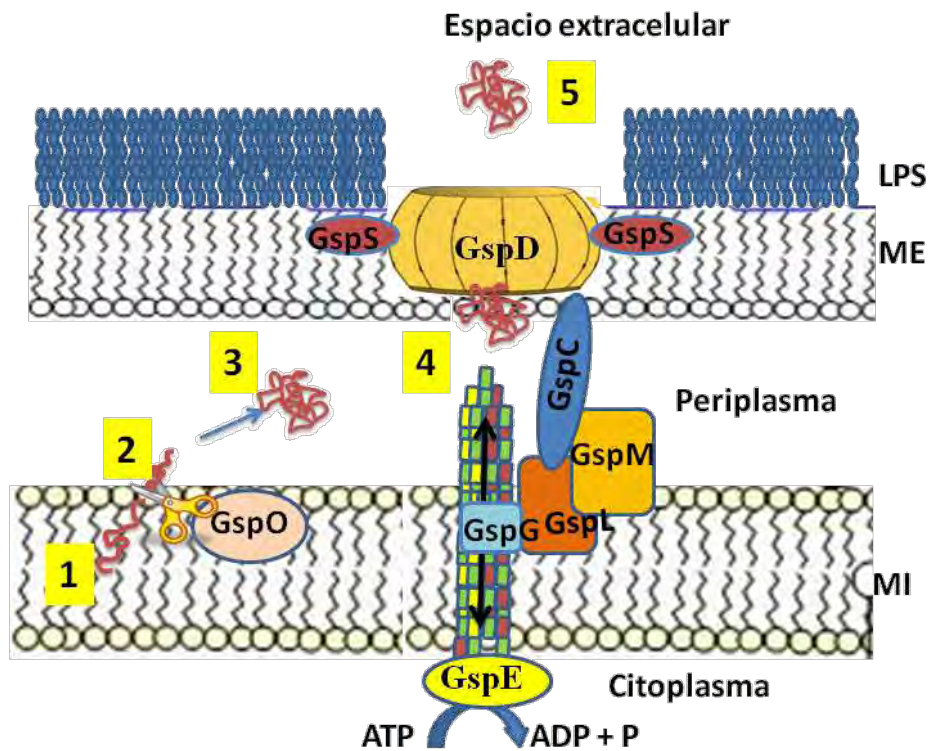


Figura 3 Esquematización de cómo las proteínas son dirigidas hacia GspD para ser secretadas. **1** La preproteína es dirigida hacia periplasma mediante el Sistema Sec. **2** El péptido señal de la proteína naciente es removido por GspO. **3** La preproteína adquiere su conformación nativa. **4** La proteína entra en contacto con las proteínas del secretón. **5** La proteína es secretada al espacio extracelular.

2 JUSTIFICACIÓN

Debido a que los inmunógenos tradicionales inducen la producción de anticuerpos contra el LPS de *Leptospira*, y estos son específicos de serovariedad, la investigación se ha dirigido hacia el estudio de proteínas de membrana externa (PMEs) que son conservadas entre serovariedades patógenas que pudieran estimular inmunidad heteróloga. Además de ser GspD una PME, ésta pertenece al principal sistema de secreción de proteínas en bacterias Gram negativas. Por lo tanto, anticuerpos dirigidos contra GspD pudieran inhibir el transporte de proteínas secretadas por el T2S.

3 HIPÓTESIS

La proteína GspD es una PME que pertenece al principal sistema de secreción bacteriana, se ha demostrado que es antigénica y es conservada entre serovariedades patógenas y no patógenas de *Leptospira* entonces:

La proteína rGspD inducirá inmunidad en hámsteres contra el desafío con un aislado virulento de *Leptospira interrogans*.

4 OBJETIVO GENERAL

- Establecer un ensayo de inmunoprotección con la proteína rGspD mediante inmunización de un grupo de hámsteres con la proteína recombinante purificada y posteriormente desafiados con 100 DL50% de un cultivo virulento de *L. interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS 46 con el fin de determinar su potencial como inmunógeno.

5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar la proteína rGspD mediante electro-elución, para inmunizar a un grupo de 10 hámsteres en 2 ocasiones a intervalos de 2 semanas.
- Determinar la Dosis Letal 50% del aislado virulento de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola (cepa LOCaS 46) y evaluar mediante la técnica de Reed & Muench para establecer un modelo de desafío.
- Establecer un ensayo de inmunoprotección mediante la inmunización con la proteína rGspD purificada de un grupo de hámsteres, desafiar a los grupos inmunizado y a los grupos testigo con 100 DL50% para evaluar la protección conferida al grupo inmunizado con la proteína recombinante.
- Establecer diferencias entre grupos inmunizados con rGspD y no inmunizados ambos desafiados, mediante índice de sobrevivencia, lesiones macroscópicas, lesiones microscópicas y cultivo, para evaluar diferencias entre los grupos.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Purificación de rGspD

Cepa bacteriana utilizada en la purificación de rGspD: Un fragmento de DNA de 1,515 pb del gen *gspD* de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo subtipo Hardjobovis cepa L550 fue clonado en el vector de expresión pET28a generando el plásmido pAL208 en *E. coli* Rosetta DE3 codon plus¹ para la expresión de rGspD_L (Rodríguez-Reyes, 2008).

6.1.1 Detección de las proteínas recombinantes en *E. coli*

Se sembró la colonia de *E. coli* Rosetta DE3 codon plus¹ recombinante en cajas de medio LB (Apéndice 1) con 50 mg/ml de km (kanamicina) y 34 mg/ml de Cm (cloramfenicol). Se tomó una colonia aislada y se le realizó PCR con los iniciadores BAP1230 (5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG G3') y BAP1231 (5' GCT AGT TAT TGC TCA GCG G 3'), para corroborar la presencia del plásmido recombinante pAL208 (pET28a-*gspD* de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo Hardjobovis) (Rodríguez-Reyes, 2008). La mezcla para la amplificación por PCR fue la siguiente:

Amortiguador de PCR 10X ²	2.5 µl
MgCl 25 mM ²	4 µl
d'NTPs 10 mM ³	1 µl
BAP1230	1 µl
BAP1231	1 µl
Colonia aislada	Una azada
Taq DNA Polimerasa ²	2 U
H ₂ O (suficiente para reacción final)	25 µl

1 Invitrogene

2 Roche Applied Science

3 Novagene

Se utilizaron las siguientes condiciones de reacción en el termociclador (PCR Sprint Thermal Cycler) 1 ciclo de 94° C / 5 minutos, seguido de 38 ciclos de 94° C /30 segundos, 56° C / 50 segundos y 72° C/ 1:30 y finalmente 1 ciclo de 72 °C/ 7 minutos.

Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE (Apéndice 1) dicho gel fue teñido con bromuro de etidio (Sigma) y fue analizado en el fotodocumentador (Molecular Imaging Systems-Kodak).

6.1.2 Expresión de la proteína rGspD

(Se realizó según Ausubel *et al.*, 1996, con modificaciones).

De una colonia transformante que contenía el plásmido pAL208 positiva a la PCR se inoculó 5 ml de caldo LB (Apéndice 1) Km-Cm. Se incubó el cultivo a 37°C en agitación orbital (Baño Maria con agitación, Presicion Mod. 50), a 180 rpm por 16 horas. Después de las 16 horas se transfirieron 5 ml del cultivo en 500 ml de caldo LB (Apéndice 1) Km-Cm, en 5 matraces con capacidad de 250 ml distribuidos con 100 ml y transfiriendo 1 ml por matraz. Nuevamente se incubó el cultivo a 37°C en agitación orbital a 180 rpm por aproximadamente 3 horas, el cultivo se midió por espectrofotometría hasta alcanzar 0.6 DO_{600nm}. Posteriormente, el cultivo se indujo agregando isopropiltio-β-D-galactósido (IPTG) a una concentración de 0.5 mM (Apéndice 1) y se incubó a 37° C, en agitación orbital a 180 rpm por aproximadamente 4 horas. Se retiró de la agitación y se centrifugó a 4° C a 2000 xg durante 8 minutos (Centrifuga Refrigerada Jouan, Mod. MR18.12) hasta obtener una pastilla, la cual fue resuspendida en 10 ml de PBS pH 7.2 (Apéndice 1), manteniéndola en hielo.

Las bacterias fueron lisadas mediante sonicación (Sonicador Cole Parmer, Mod. CPX600) con las constantes: amplitud 66%, pulsos de 9.9 seg y descansos de 9.9 seg. Se repitieron los ciclos de sonicación hasta observar la eliminación de la turbidez del sonicado. Una vez realizada la sonicación la solución se centrifugó a 4° C 1000 xg por 10 minutos (Centrifuga refrigerada Savant, Mod. SFR13K). El sobrenadante se distribuyó en volúmenes de aproximadamente 800 µl en tubos eppendorf ® y se guardó a -20° C hasta su uso. La expresión se confirmó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y por

inmunotransferencia tipo Western blot utilizando anticuerpo monoclonal anti-T7 (T7·Tag Antibody HRP Conjugate¹)

Electroforesis en gel de poliacrilamida

(Se realizó según protocolo de Laemmli (1970), con modificaciones)

Las proteínas totales obtenidas de los sonicados de *E. coli* Rosetta DE3¹ conteniendo el plásmido pAL208, así como el control positivo (sonicado de *E. coli* Rosetta DE3¹ con plásmido pAL208 previamente demostrado mediante inmunodetección tipo Western blot) y un control negativo (sonicado de *E. coli* Rosetta DE3¹ con plásmido pET28a), fueron mezclados con amortiguador de muestra 4X conteniendo 2-β-mercapto etanol (Apéndice 1) a una relación 3:1 y posteriormente incubados en baño María por 10 minutos a 80° C.

Las muestras se centrifugaron a 7000 xg a temperatura ambiente (Centrifuga Fisher Scientific) por 5 minutos.

Las proteínas totales que se obtuvieron de la sonicación así como los controles, fueron separadas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12%.

Inicialmente, se preparó el gel separador en la parte inferior y el gel concentrador en la parte superior formando un solo gel, se colocaron los peines y los geles se dejaron polimerizar.

Posteriormente se armó la cámara de electroforesis y se cubrió con amortiguador de electroforesis (Apéndice 1). Las muestras de bacterias sonicadas de *E. coli* Rosetta transformante y los controles previamente preparados se colocaron en los pozos a un volumen de 15 µl por pozo así como el marcador de peso molecular (Mark-12²).

La electroforesis se realizó a 50 Volts por 45 minutos para el gel concentrador y a 100 Volts por 2:30 minutos para el gel separador. (Cámara de Electroforesis Vertical Mod. Mini-PROTEAN II Cell BIORAD). Al término de la electroforesis el gel se tiñó con solución azul de Coomasie (Apéndice 1) en agitación orbital a 150 rpm y a temperatura ambiente por toda la noche (Incubadora Dual Action Shaker).

1 Novagen

2 Invitrogen

Trascurrido el tiempo, el gel se colocó en solución desteñidora de Coomasie (Apéndice 1), en agitación orbital a 150 rpm y a temperatura ambiente (Incubadora Dual Action Shaker), cambiando la solución en dos ocasiones hasta observar bandas de proteína bien definidas. La imagen fue registrada electrónicamente (Molecular Imaging Systems-Kodak).

Inmunotransferencia tipo Western blot

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida de los sonicados de *E. coli* Rosetta conteniendo el plásmido pAL208 así como los controles mencionados y el marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Standards, Dual Color)¹.

El gel para transferencia fue retirado de los vidrios, para transferir la proteína a la membrana de nitrocelulosa² de 0.45 µm de poro.

La membrana de nitrocelulosa, las esponjas y el papel filtro se humectaron por separado con solución Towbin (Apéndice 1) durante 10 minutos, el cassette de transferencia se armó de la siguiente forma:

Polo negativo:

- 1 Esponja
- 2 Papel filtro
- 3 Gel
- 4 Membrana de nitrocelulosa
- 5 Papel filtro
- 6 Esponja

Polo positivo

El cassette se introdujo en la cámara de transferencia¹ y está se cubrió con solución amortiguadora de Towbin (Apéndice 1), la cámara fue colocada en un recipiente con hielo y una bala magnética para circulación del amortiguador frío.

1 BIO-RAD

2 Hybond-C, Amersham LIFE SCIENCE

La transferencia se realizó a 100 Volts durante 1 hora. Al término de la transferencia, la membrana fue bloqueada en una solución de TBS-T (Apéndice 1) durante 30 minutos, a temperatura ambiente y en agitación orbital a 150 rpm.

Para la inmunodetección tipo Western blot se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-T7 (T7·Tag Antibody HRP Conjugate-Novagene), dirigido contra la región del péptido del fago T7. En un recipiente de plástico, el anticuerpo anti-T7 HRP fue diluido 1:5,000, se colocó la membrana de nitrocelulosa dejándola a temperatura ambiente en agitación orbital 150 rpm durante 16 horas.

Transcurridas las 16 horas la membrana se lavó por cuatro periodos de 5 minutos en solución TBS-T (Apéndice 1), finalmente se lavó con solución TBS (Apéndice 1), por 2 periodos de cinco minutos.

El revelado de la membrana se realizó sumergiendo ésta en 100 ml de TBS con 20 ml de metanol y 60 μ l de peróxido de hidrógeno al 30%, en agitación orbital a 50 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente hasta observar la presencia de bandas de proteína así como bandas del control positivo.

6.1.3 Purificación de la proteína rGspD

La proteína fue purificada mediante la técnica de electro-elución, se prepararon las muestras de *E. coli* Rosetta de reciente transformación con el plásmido pAL208, con solución amortiguadora de muestra 4X. Se realizó electroforesis en cuatro geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS al 12%, con un grosor de 0.75 mm colocando un peine de 5 pozos, en 4 de ellos se colocó la bacteria transformada con pAL208 sonicada y en el pozo restante albúmina sérica bovina (60kDa) que sirvió como banda de referencia para ubicar fácilmente a la proteína rGspD_L que tiene un peso de 63 kDa. La electroforesis se llevo a cabo bajo las condiciones previamente descritas. Después de la electroforesis el gel se colocó en una solución fría de KCl 250 mM (Apéndice 1) a 4°C por aproximadamente 15 minutos hasta la visualización de bandas de proteína, que al precipitarse con el KCl se notaron de color blanco. El gel se colocó en un vidrio y con ayuda de una lámpara de luz blanca las proteínas se observaron a contraluz, tomando como

referencia la albúmina bovina sérica, se cortó con una navaja de bisturí la banda de la proteína rGspD (63 kDa) ubicada adyacente a donde se encuentra la albúmina (60 kDa). La banda se cortó en pequeños fragmentos y se mantuvo humectada con amortiguador de elusión (Apéndice 1) para evitar la deshidratación hasta ser depositada en el tubo de vidrio, ensamblado a la cámara de electro-elusión (Electro-eluter Mod. 422 BIORAD). La cámara se llenó con amortiguador de elusión (Apendice 1).

La electro-elusión se realizó a 8 mA/ tubo durante 16 horas, después de las 16 horas se retiró el tubo de vidrio del adaptador de silicón y con una punta de 200 µl se tomó con cuidado el eluido que contenía la proteína purificada. El volumen recuperado por tubo fue aproximadamente de 600 µl, se colocó en un tubo Eppendorf® de capacidad de 1.5 ml, se identificó y se almacenó a -20°C hasta su uso. Se comprobó la presencia de rGspD de los eluidos mediante inmunotransferencia tipo Western blot.

Concentración de la proteína rGspD.

Del eluido recuperado se confirmó la presencia de rGspD mediante inmunodetección tipo Western blot y en gel de poliacrilamida teñido con solución azul de Coomasie. Se colocaron aproximadamente 4 ml de los productos eluidos a un tubo con sistemas de filtración con punto de corte de 30 kDa (Amicon Ultra 30,000 MWCO Millipore). Los tubos se centrifugaron a 3000 xg a 4 °C durante 25 minutos concentrando en un volumen final de 250 µl.

Inmunodetección tipo Western blot utilizando anticuerpo primario anti-GspD.

Una vez concentrada la proteína rGspD se corroboró su presencia mediante inmunodetección tipo Western blot, con la técnica previamente descrita, esta vez se utilizó el anticuerpo primario anti-GspD producido en conejo (Alcaraz-Sosa, 2008) diluido 1:100 y se incubó a temperatura ambiente por 16 horas, también se utilizó un anticuerpo secundario

anti-IgG de conejo HRP diluido 1:400 incubado a 37° C por 2 horas, el revelado se realizó con la técnica ya descrita

6.1.4 Cuantificación de la proteína rGspD

La cuantificación de la proteína rGspD se realizó mediante un sistema comercial (Micro BCA Protein Assay Kit PIERCE). La cuantificación de proteínas se logra a partir de la quelación de algunos compuestos químicos, regularmente con los enlaces peptídicos. El ensayo BCA (Ácido bicinonínico) combina la reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} por proteína en un medio alcalino, con una alta sensibilidad y detección colorimétrica selectiva de los cationes cúpricos (Cu^{1+}) por ácido bicinonínico. Ocurre en dos pasos: el primer paso es la quelación de cobre con proteína en un medio alcalino, formando un complejo azul.

Los polipéptidos o las proteínas reaccionan produciendo un complejo de azul a violeta, un ión cuprico forma un complejo coloreado con 4-6 enlaces peptídicos, este complejo absorbe luz a 540 nm, la intensidad de color producido es proporcional al número de enlaces peptídicos participando en esta reacción. En el segundo paso el color púrpura es formado por la quelación de dos moléculas de BCA con un ion cúprico. Los rangos en la formación de color dependen de la temperatura de incubación, tipo de proteínas presentes y cantidades relativas de aminoácidos contenidos en las proteínas. La cuantificación de la proteína recombinante se realizó por espectrofotometría siguiendo el protocolo según el fabricante y el cálculo se realizó por análisis de regresión en el programa Excel ®.

En los diferentes procesos para la purificación de la proteína rGspD se le realizaron modificaciones a las descritas por Rodríguez-Reyes (2008).

6.2 Determinación de DL50%

Cepa de infección

Se utilizó la cepa virulenta LOCaS-46 de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola aislada de un perro asintomático de la ciudad de México (Castillo-Sánchez, 2008), dicha

cepa ha sido mantenida en medio Fletcher enriquecido con 8-10 % de suero de conejo (Apéndice 1) y su virulencia mantenida por pases en hámster.

Para determinar la DL50% y el ensayo de potencia se utilizó el hámster como modelo animal debido a que es el modelo más apropiado (Oliva *et al.*, 1994; Haake, 2006).

Manejo de los hámsteres

Los animales se mantuvieron en un área de aislamiento con ventilación e iluminación adecuadas. Las cajas se mantuvieron limpias, secas y en condiciones ambientales aceptables, las dimensiones brindaron el espacio necesario para satisfacer las necesidades fisiológicas, permitiendo movimientos normales y ajustes posturales característicos de la especie. Se realizó la limpieza de las cajas una vez por semana, se identificaron de manera individual con tarjeta y se anotaron diariamente las observaciones relevantes, el material de la cama de los animales alojados fue de viruta, que garantiza absorción de orina, excremento y desperdicios de agua.

Se revisaron diariamente los animales para detectar cambios en el comportamiento, enfermedades, heridas o muerte. Se administró agua potable a libre acceso así como el alimento, que cuenta con la composición nutricional necesaria para la especie (NOM-062-ZOO-1999).

6.2.1 Activación de la virulencia de la cepa LOCaS-46 de *L. interrogans*

Se realizó la activación de la cepa con el fin de alcanzar el mayor índice de leptospiremia tisular lo cual es necesario para realizar ensayos de desafío, con el fin de asegurar la infección. A partir del aislado de la cepa LOCaS-46 mantenido en medio semisólido Fletcher se realizó la inoculación vía IP de 3 hámsteres (3 semanas de edad con un de peso 39-40gr) con 0.5 ml del cultivo mencionado.

A la muerte de los animales se realizó el estudio sistemático de necropsia, visualización de frotis de riñón, hígado y orina en campo oscuro. Se realizó la recuperación del microorganismo en forma estéril cultivando en medio semisólido Fletcher y en medio

liquido EMJH (Apendice1) para recuperación de la cepa activada (Fajardo *et al.*, 1998) (Figura 5).

Para la determinación de la DL50% se utilizaron 3 grupos (n=8) y como grupos testigos 2 grupos (n=3) ambos fueron tratados según la Figura 4. Para calcular la DL50% se utilizó la técnica de Reed & Muench.

6.3 Prueba de Potencia

Para la prueba de potencia se formaron 3 grupos de 10 animales cada uno, para inmunizar a un grupo con la proteína rGspD purificada mediante electro-elusión, el segundo grupo no fue inmunizado y el tercer grupo fue inmunizado con un inmunógeno comercial elaborado con extracto de membranas de *Leptospira* de las serovariedades Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae y Pomona. Los grupos se desafiaron con la cepa LOCaS 46.

También se formaron 2 grupos testigo, un grupo fue inmunizado con la proteína rGspD con el fin de confirmar que la proteína recombinante no causara algún efecto no deseado en los animales, el otro grupo se le administró adyuvante incompleto de Freund. Ambos grupos no se desafiaron.

Calculo de las concentraciones de *Leptospira*

Se prepararon diluciones seriadas en PBS (Ápendice 1) para lograr concentraciones de 10, 100 y 1000 leptospiras en 0.5 ml de PBS (Figura 6). El conteo para lograr las diferentes concentraciones de leptospiras se realizó mediante la cámara de Petroff-Häuser en el microscopio de campo oscuro (Figura 6)

6.3.1 Inmunización:

Se realizó un esquema de inmunización, se formaron 3 grupos para experimentación (n=10 hámsteres hembras y machos de 8 semanas) y 2 grupos como testigos (n=3 hámsteres hembras y machos de 8 semanas) (Cuadro 7).

El grupo 1 se inmunizó vía IM profunda en 2 ocasiones a intervalos de 2 semanas, con un total de 100 µl por hámster, 50 µg de la proteína recombinante GspD mezclada con

adyuvante incompleto de Freund¹ relación 1:1, la cual se homogenizó por aproximadamente 30 min.

El grupo 2 se le administraron 100 µl de adyuvante incompleto de Freund¹ en 2 ocasiones a intervalos de 2 semanas, vía IM profunda.

El grupo 3 fue inmunizado con el inmunógeno comercial en 2 ocasiones a intervalos de 2 semanas, vía SC dilución 1:80 en un total de 250 µl por hámster.

El grupo 4; grupo testigo fue inmunizado vía IM profunda por 2 ocasiones a intervalos de 2 semanas, con 50 µg de la proteína rGspD mezclada con adyuvante incompleto de Freund¹ relación 1:1 en un total de 100 µl por hámster.

El grupo 5; grupo testigo fue inoculado con adyuvante incompleto de Freund¹ 100 µl por hámster, vía IM profunda.

Todos los grupos fueron alojados y alimentados con las mismas condiciones y revisados diariamente.

Cuadro 7 Esquema de inmunización

Grupo	Animales	Inmunización	Cantidad	Vía	Días
Grupo 1	n=10	50 µg GspD + AIF ¹	100 µl	IMP	0-14
Grupo 2	n=10	AIF ¹	100 µl	IMP	0-14
Grupo 3	n=10	Inmunógeno comercial	250 µl	SC	0-14
Testigo	n=3	50 µg GspD + AIF ¹	100 µl	IMP	0-14
Testigo	n=3	AIF ¹	100 µl	IMP	0-14

AIF= Adyuvante incompleto de Freund

¹ Sigma

6.3.2 Activación de la virulencia de la cepa LOCaS 46 de *Leptospira interrogans*

Se activó nuevamente la cepa virulenta de *L. interrogans* LOCaS-46 a partir de cultivo de riñón aislado en el ensayo de la determinación de la DL50%, mantenido en medio semisólido Fletcher, se inocularon 2 hámsteres (3 semanas de edad, peso 39-40gr) con 0.5 ml del cultivo vía IP. A la muerte de los animales se realizó el estudio sistemático de necropsia donde se recolectaron muestras de hígado, riñón y orina, se cultivó en medio semisólido Fletcher para recuperación de la cepa activada, los cultivos se mantuvieron en incubación a 30° C por 7 días hasta ver el característico anillo de Dinger. Después de los 7 días se observó por microscopia de campo oscuro la presencia y movilidad de las leptospiras.

6.3.3 Ensayo de desafío con la cepa LOCaS-46

Se realizó conteo de microorganismos en la cámara de Petroff-Häuser de la cepa LOCaS 46 a partir de medio semisólido Fletcher. Se realizaron diluciones hasta lograr una concentración de 100 DL50% equivalente a 1000 leptospiras por ml del cultivo.

Se inoculó vía intraperitoneal a los grupos de hámsteres 1, 2 y 3 (Cuadro 8) con 0.5 ml de cultivo con una concentración de 100 DL50% diluido con PBS pH 7.2 estéril (Apéndice 1), los grupos 4 y 5 no fueron desafiados.

Cuadro 8 Esquema de desafío

Grupo	Inmunización	No. de animales	Desafío	Cantidad	Vía
Grupo 1	50 µg GspD + AIF ¹	n=10	+	100 DL ₅₀	IP
Grupo 2	AIF ¹	n=10	+	100 DL ₅₀	IP
Grupo 3	Inmunógeno comercial	n=10	+	100 DL ₅₀	IP
Grupo 4	50 µg GspD + AIF ¹	n=3	-	-	-
Grupo 5	AIF ¹	n=3	-	-	-

+ Grupos desafiados - Grupos no desafiados AIF=Adyuvante incompleto de Freund

¹ Sigma

Los animales fueron revisados diariamente 3 veces al día, a los animales muertos se les realizó el estudio sistemático de necropsia, los animales que no murieron fueron sacrificados después de los 28 días pos-desafío con una dosis de 0.6 ml de Pentobarbital sodico vía IP (NOM-062-ZOO-1999).

De los animales que murieron y de los sacrificados se obtuvieron muestras de órganos representativos para diagnóstico de leptospirosis (Cuadro 9).

6.3.4 Estudios para diagnóstico de leptospirosis

Observación en campo oscuro

Las muestras (Cuadro 9) se analizaron por microscopia de campo oscuro en frotis húmedo a 400X aumentos (Microscopio Karl Zeiss), las muestras de los órganos fueron maceradas en condiciones de esterilidad y diluidas con medio liquido EMJH, la orina fue extraída por punción vesical y observada de manera directa.

Cultivo bacteriológico

La necropsia se realizó en condiciones de esterilidad, se tomo el órgano (Cuadro 9), se maceró en una jeringa de 5 ml y se cultivó en tubos de medio semisólido Fletcher (5 ml) y medio liquido EMJH (3 ml), la sangre y la orina se depositaron directamente a los medios de cultivo. Los tubos se identificaron, se incubaron a 30° C y se revisaron a los 7 días por observación en campo oscuro.

Histopatología

Después de realizar el estudio sistemático de necropsia los riñones fueron conservados en formalina amortiguada al 10% (Apéndice 1) y enviadas para estudios de histopatología al departamento de Patología de la FMVZ-UNAM. Se enviaron riñones de hámsteres representativos de cada grupo para estudio histopatológico. Del grupo inmunizado con

rGspD se enviaron los riñones del H2, H3, H4 y H6. Del grupo no inmunizado se enviaron 4 riñones de H1, H2, H3 y H4, Del grupo inmunizado con el inmunógeno comercial se enviaron 8 riñones del H1, H2, H3, H4, H6, H7, H8 y H9. Estos grupos desafiados con la cepa LOCaS 46. Después de la recuperación de las muestras de los animales muertos y sacrificados los cadáveres se desecharon según las especificaciones establecidas (NOM-087-ECOL-1995).

Cuadro 9 Muestras y estudios para diagnóstico de leptospirosis				
Muestra	Microscopía campo oscuro	Cultivo EMJH-Fletcher	Patología Macro- Microscópica	AM
Riñón	√	√	√	NA
Hígado	√	√	√	NA
Pulmón	NA	NA	√	NA
Sangre	√	√	NA	√
Orina	√	√	NA	NA

√: Se realizaron

NA: No aplica

Aglutinación microscópica (AM)

La sangre fue extraída por punción intracardiaca poco antes de que el animal muriera, posteriormente fue centrifugada para la separación del suero y este fue conservado a -20° C hasta su uso.

Para realizar la prueba de AM se utilizó la cepa de referencia de *L. interrogans* serovariedad Canicola mantenida en medio de cultivo líquido EMJH, se realizó una resiembra 8 días antes y se incubó a 30° C para tener un cultivo fresco al momento de la prueba. Se revisaron por microscopía de campo oscuro los cultivos sembrados de la cepa de referencia cada 3° día para descartar contaminación con otros microorganismos, se observó viabilidad de las leptospira. Se revisaron los tubos de cultivo para observar una turbidez de 0.5 en la escala de Mac Farland. La AM se realizó en microplacas de plástico de fondo plano de 96 pozos.

El suero fue descongelado y nuevamente centrifugado para eliminar artefactos presentes en el mismo, se realizó una dilución con solución amortiguadora de fosfatos SAF (Apéndice 1) dilución 1:25 con 40 µl de suero diluido en 960 µl de SAF.

En la placa de plástico se colocó de la fila A1-A12 la dilución 1:25 de los sueros a analizar, del pozo B1-H12 se colocó solución SAF (50 µl) posteriormente en los pozos con dilución 1:25 (A1-A12) se agregaron 50 µl de la cepa de referencia, se homogenizó y se realizaron diluciones con ayuda de una micropipeta multicanal en los siguientes pozos conteniendo solución SAF. Se cubrió la microplaca, se incubó a 30° C 2 horas y se realizó la lectura.

Análisis Estadístico.




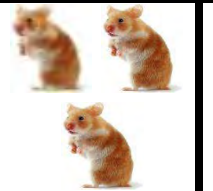


El análisis descriptivo en algunos casos se presenta como reporte de distribución de frecuencias, en otros casos se presenta con proporciones (%) con intervalos de confianza del 95% o medias aritméticas con error estándar de la media, dependiendo del tipo de variable a analizar. Los cálculos se realizaron con los datos presentados en el Apéndice 2 base de datos, 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 se realizó para buscar diferencias o similitudes en las proporciones de verdaderos positivos entre las pruebas de: cultivo bacteriano (aislamiento), lesiones macroscópicas y microscópicas (histopatología H&E) en tejidos fijados de riñón, fueron explorados mediante la prueba de Fisher χ^2 ($p = 0.05$).

Los análisis se realizaron en los programas NCSS 2000 y PASS 2000 (Jerry Hintze ©2001).

Figura 4 Grupos para la determinación de DL50% de la cepa LOCaS 46 de

***L. interrogans* Serovariedad Canicola**

<p>n=8 Edad: 13 sem Grupo: Concentración =10 leptospiras Víaa i.p. Dosis 0.5 ml</p>	<p>n=8 Edad: 13 sem Grupo: Concentración =100 leptospiras Vía i.p. Dosis 0.5 ml</p>	<p>n=8 Edad: 13 sem Grupo: Concentración =1000 leptospiras Vía i.p. Dosis 0.5 ml</p>	<p>n=3 Edad: 13 sem Grupo: Testigo + Cultivo masivo de leptospiras. Vía i.p. Dosis 0.5 ml</p>	<p>N=3 Edad: 3 sem Grupo: Testigo + Cultivo masivo de Leptospiras. Vía i.p. Dosis 0.5 ml</p>	<p>n=3 Edad: 13 sem Grupo: Testigo - S.A.F. Vía i.p. Dosis 0.5 ml</p>
					

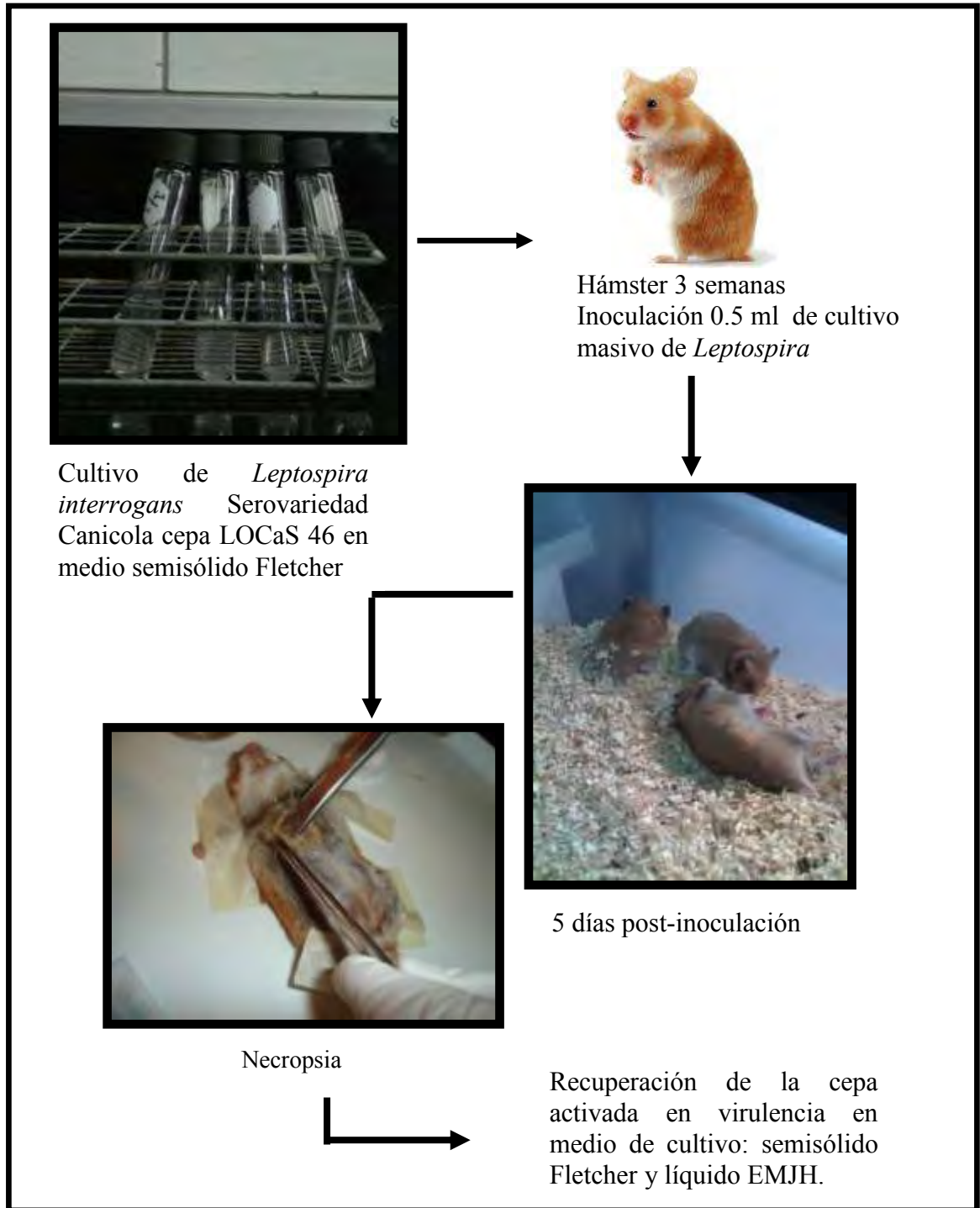


Figura 5 Esquema donde se muestra el procedimiento para la activación de la virulencia de la cepa LOCaS-46 de *L. interrogans* serovariedad Canicola.

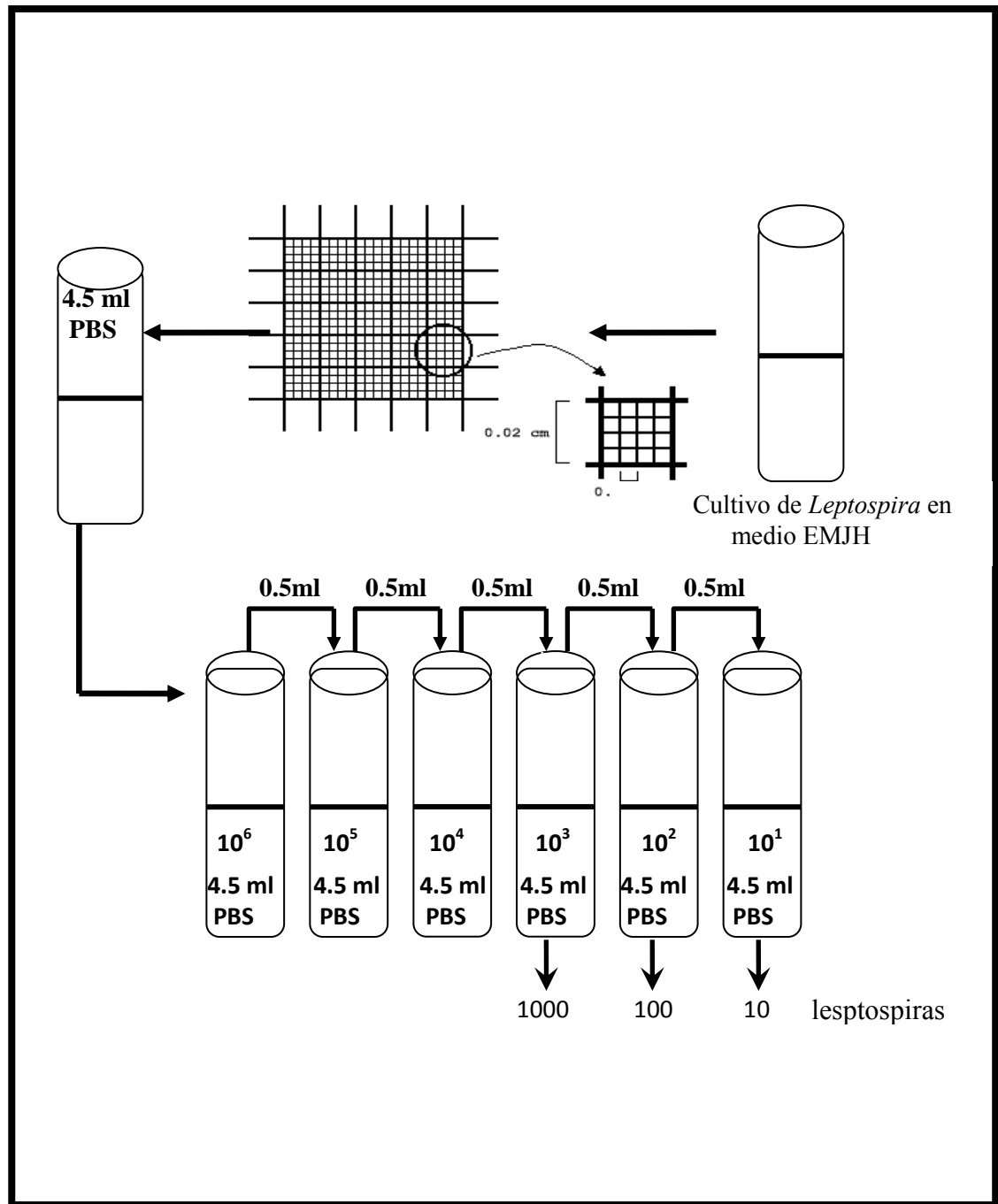


Figura 6 Esquema del conteo de leptospiras a partir de un tubo de cultivo de *Leptospira* en medio líquido (EMJH) utilizando la cámara de Petroff Hausser.

7 RESULTADOS

7.1 Purificación de la proteína rGspD.

7.1.1 Detección de la proteína recombinante rGspD.

La presencia de pAL208 en colonias recombinantes de reciente transformación, desarrollaron en LB Km-Cm y fueron confirmadas mediante PCR con los iniciadores BAP1230 y BAP1231 (Figura 7).

7.1.2 Expresión de rGspD

La expresión de rGspD en las colonias inducidas por incorporación de IPTG, se confirmó mediante inmunotransferencia tipo Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-T7-HRP. Se observó la presencia de bandas en la membrana de nitrocelulosa con el peso aproximado de 63 kDa (Figura 8).

7.1.3 Purificación de la proteína rGspD.

Tras la demostración de la proteína rGspD mediante inmuno-detección tipo Western blot utilizando el anticuerpo monoclonal anti-T7-HRP y la purificación de rGspD mediante la técnica de Electro-elución. Se confirmó la presencia de las bandas purificadas de la proteína recombinante nuevamente mediante inmunodetección tipo Western blot. Se observaron bandas con un peso aproximado de 63 kDa. Los eluidos que no fueron identificados mediante Western blot se desecharon, también se verificó la presencia de la proteína a través de electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. Se observaron bandas únicas y bien definidas (Figura 9). Al realizar las modificaciones a la técnica descrita por Rodríguez-Reyes (2008) durante los diferentes procesos de purificación de la proteína rGspD se observó en el análisis electroforético en gel de poliacrilamida al 12% y en la inmunodetección tipo Western blot una concentración más elevada (Figura 1)

Para la corroboración de la presencia de proteína rGspD de los productos purificados mediante la técnica de electro-elución, se realizó inmunodetección tipo Western blot utilizando el anticuerpo Anti-GspD. Se obtuvo una banda de aproximadamente 63 kDa la cual fue muy evidente ya que la proteína se encontraba en una concentración elevada (Figura 11).

7.1.4 Cuantificación de la proteína rGspD

Al cuantificar el concentrado de proteínas mediante el sistema Kit Micro BCA Protein Assay Kit resultó una absorbancia del 324 nm a una $DO_{562\text{ nm}}$. Realizando la curva de concentración se calculó por análisis de regresión un aproximado de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de lo cual se obtuvo el equivalente a 2.25 mg de proteína recombinante.

7.2 Determinación de la DL 50 % en Hámster

7.2.1 Activación de la cepa

Los 3 hámsteres inoculados con la cepa LOCaS 46 mostraron una signología característica de leptospirosis en esta especie, a los 4 días pos-inoculación comenzando por: depresión, anorexia, deshidratación, pelo hirsuto, hematuria y finalmente muerte (Figura 12). La muerte de los 3 hámsteres inoculados se logró a los 5 días post inoculación y se observó la presencia de leptospiras en el microscopio de campo oscuro principalmente en frotis de hígado y orina.

7.2.2 Dosis Letal 50%

El resultado de la DL50% para el aislado virulento de *L. interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS 46 en hámster fue de 10 leptospiras o menos por la técnica de Reed & Muench.

La mayoría de los animales; mas del 50% de los grupos inoculados con las diferentes diluciones (10, 100 y 1000 leptospiras) comenzaron a presentar signología de leptospirosis entre los días 7-10 post inoculación. Signos de depresión, anorexia, deshidratación, disnea. También se presentó signología nerviosa; incoordinación, postración, debilidad muscular e hiperestesia y posteriormente la muerte.

La orina de los hámsteres enfermos con leptospirosis en diferentes grupos mostró una pérdida de turbidez; que se debe a la pérdida de densidad urinaria relacionada con falla renal, también se presentó hematuria. En contraste con la orina de animales sanos la cual presenta un aspecto amarillo lechoso y cierta turbidez (Figura 13).

En la mayoría de los grupos las principales lesiones se presentaron en pulmones, hígado y riñones. Los animales del grupo testigo positivo de 4 semanas comenzaron a presentar signología característica de leptospirosis a los 5 días post-inoculación muriendo al día siguiente (Figura 14).

En animales que morían durante los días 8-9 días post-inoculación las lesiones principales se encontraron en pulmones, presentándose hemorragia multifocal (Figura 15). Los riñones presentaron congestión severa y aumento de tamaño, el hígado también presentó congestión severa y aumento de tamaño (Figura 16). En el cultivo bacteriológico de *Leptospira* se logró el aislamiento del microorganismo en la mayoría de los órganos.

7.3 Prueba de Potencia

7.3.1 Inmunización

Durante el periodo de inmunización un animal perteneciente al grupo testigo (inmunizado con rGspD y no desafiado) murió al día 3 post inmunización, se le realizó el estudio

sistemático de necropsia encontrándose anomalías congénitas gastrointestinales, de lo cual no se tomaron muestras y tampoco se relaciono con leptospirosis. Los animales pertenecientes a los cinco grupos permanecieron estables durante este periodo.

7.3.2 Activación de la virulencia de la cepa LOCaS 46

Los 2 hámsteres inoculados para activar la virulencia de la cepa murieron a los 5 días post inoculación presentando signología característica de leptospirosis. Al cultivo bacteriológico se recuperó el microorganismos y se verificó la presencia de las leptospiras en microscopio de campo oscuro; se observó presencia en gran cantidad y viabilidad de la cepa LOCaS 46.

7.3.3 Ensayo de desafío con cepa LOCaS-46 de *Leptospira*

Se registró el número de animales muertos y sobrevivientes al desafío (Cuadro 10).

Cuadro 10 Esquema de desafío (animales muertos y sobrevivientes)					
Grupo	Inmunización	No de animales			Desafío
		Total	Muertos	Sobrevivientes	
Grupo 1	50 µg GspD + AIF	n=10	2	8	+
Grupo 2	AIF	n=10	4	6	+
Grupo 3	Inmunógeno comercial	n=10	2	8	+
Testigo	50 µg GspD + AIF	n=3	1	2	-
Testigo	AIF	n=3	1	2	-

AIF= Adyuvante incompleto de Freund

Resultados por grupo

Grupo 1: Inmunizado con rGspD y desafiado.

De los hámsteres que fueron inmunizados con la proteína rGspD y desafiados; murieron 2 animales y los 8 restantes fueron sacrificados. El H1 y H2 no murieron con signos de

leptospirosis. El H1 se veía más débil que el resto del grupo, a la necropsia el pulmón de este animal se veía macroscópicamente sin cambios patológicos aparentes, el hígado se mostró congestionado, sólo se recuperó un riñón el cual se veía congestionado. El H2 murió a causa de peritonitis que se atribuyó a un absceso en el abdomen del lado derecho, a la necropsia el pulmón presentó hemorragias multifocales, el hígado y el riñón se mostraron congestionados, de este animal se aisló el microorganismo a partir de orina. Del H3-H10 a la necropsia no se observaron macroscópicamente cambios patológicos aparentes en pulmón, hígado, riñón y orina, de estos animales no aisló el microorganismo. En la prueba de aglutinación microscópica (AM) se recuperó suero de 8 hámsteres, de los cuales solo el H9 resultó positivo con título de 1:100 (Cuadro 11).

Cuadro 11 Resultados grupo inmunizado con rGspD y desafiado

Hámster	Muerte	Aislamiento	AM
H1	M	NO	*
H2	M	SI en orina	*
H3	S	NO	Negativo
H4	S	NO	Negativo
H5	S	NO	Negativo
H6	S	NO	Negativo
H7	S	NO	Negativo
H8	S	NO	Negativo
H9	S	NO	Positivo
H10	S	NO	Negativo

H=Hámster M=Muerte S=Sacrificio * No se recuperó suero

Grupo 2: No inmunizado y desafiado.

Del grupo 2 de hámsteres no inmunizados y posteriormente desafiados murieron 4 animales y los demás fueron sacrificados. El H1, H2, H3 y H4 murieron con aparente signología de leptospirosis, presentando depresión, anorexia, la orina se notaba con falta de concentración así como hematuria. Al estudio de necropsia el pulmón mostró hemorragias multifocales, el

hígado presentó congestión al igual que el riñón. Del H1 no se logró el aislamiento del microorganismo, del H2, H3 y H4 si se aisló *Leptospira* (Figura 21). Del H5-H10 al estudio de necropsia no se observaron cambios patológicos aparentes en pulmón, hígado, riñón y orina. En la prueba de aglutinación microscópica (AM) se recuperó suero de 5 hámsteres, de los cuales todos resultaron negativos (Cuadro 12).

Cuadro 12 Resultados grupo no inmunizado y desafiado

Hámster	Muerte	Aislamiento	AM
H1	M	NO	*
H2	M	SI=Orina/Sangre	*
H3	M	SI=Orina/Hígado	*
H4	M	SI=Orina	*
H5	S	NO	Negativo
H6	S	NO	Negativo
H7	S	NO	Negativo
H8	S	NO	Negativo
H9	S	NO	*
H10	S	SI=Riñón	Negativo

H=Hámster M=Muerte S=Sacrificio * No se recuperó suero

Grupo 3: Inmunizado con el inmunógeno comercial y desafiado.

Del grupo 3 de hámsteres inmunizados con el inmunógeno comercial y desafiados murieron 2 animales el H1 y H9, los demás fueron sacrificados. El H1 murió a causa de peritonitis que se atribuyó a un absceso en el abdomen del lado derecho, a la necropsia el pulmón presentó hemorragias multifocales, el hígado y el riñón se mostraron congestionados, de este animal no se logró aislamiento del microorganismo. El H2 presentó una masa en el pulmón, lesión no relacionada con leptospirosis de este animal se logró el aislamiento del microorganismo de hígado y riñón. El H2-H8 y H10 fueron sacrificados sin aparente signología de leptospirosis, a la necropsia no se observaron macroscópicamente cambios patológicos aparentes en pulmón, hígado, riñón y orina. El H10 presentó esplenomegalia.

Del H4 se aisló *Leptospira* de riñón de los demás hámsteres no se aisló *Leptospira*. El H9 murió a causa de peritonitis que se atribuyó a un absceso en el abdomen del lado derecho, a la necropsia el pulmón no presentó cambios patológicos aparentes, el hígado y el riñón se mostraron congestionados

En la prueba de aglutinación microscópica (AM) se recuperó suero de 8 hámsteres, de los cuales resultaron positivos el H2 con título de 1:12,800, el H4 con título de 1:800, el H8 con título de 1:200, el resto del grupo resultó negativo a esta prueba (Cuadro 13).

Cuadro 13 Resultados grupo inmunizado con el inmunógeno comercial y desafiado

Hámster	Muerte	Aislamiento	AM
H1	M	NO	*
H2	S	SI=Hígado/ Riñón	Positivo
H3	S	NO	Negativo
H4	S	SI=Riñón	Positivo
H5	S	NO	Negativo
H6	S	NO	Negativo
H7	S	NO	Negativo
H8	S	NO	Positivo
H9	M	NO	*
H10	S	NO	Negativo

H=Hámster M=Muerte S=Sacrificio * No se recuperó suero

Grupo 4: Grupo testigo inmunizado con rGspD y no Desafiado.

El H1 murió en el periodo de inmunización a la necropsia reveló que fue por una anomalía gástrica. Los dos animales pertenecientes a este grupo permanecieron estables durante todo el ensayo. El H2 murió por pelea con el H3 el día del sacrificio, el H3 se mostró aparentemente sano. De este grupo no se aisló *Leptospira*.

Grupo 5: Grupo testigo no inmunizado y no desafiado.

Los 3 hámsteres de este grupo se mostraron aparentemente sanos en todo el ensayo, al estudio de necropsia no hubo cambios patológicos aparentes. De este grupo no se aisló *Leptospira*.

Sobrevivencia

La media de supervivencia en el grupo inmunizados con la proteina rGspD y desafiado fue de 27.2 dias, en el grupo no inmunizados y desafiado fue de 21.9 dias, en el grupo inmunizados con el inmunogeno comercial y desafiado fue de 28.8 dias. Sin diferencia estadística (Figura 17).

6.3.4 Estudios para diagnóstico de leptospirosis

Cultivo

Del grupo inmunizados con la proteina rGspD y desafiado se obtuvo el 10% de aislados, del grupo no inmunizados y desafiado se obtuvo el 40% de aislados, en el grupo inmunizados con el inmunogeno comercial y desafiado se obtuvo el 20% de aislado ($p=0.2$) (Figura 18).

Lesiones macroscópicas

Se evaluaron las lesiones macroscópicas con intervalo de confianza del 95% en hígado, riñón y pulmón comparando entre los grupos desafiados con el aislado virulento de *L. interrogans* cepa LOCaS 46. En el grupo inmunizados con rGspD y desafiado se observó congestión en hígado (30%), congestión en riñón (20%), hemorragias en riñón (20%) y hemorragias en pulmón (10%). En el grupo no inmunizado y posteriormente desafiados se observó congestión en hígado (40%), congestión en riñón (40%), hemorragia en riñón (40%) y hemorragia en pulmón (30%). En el grupo inmunizado con el inmunogeno comercial se observó congestión en hígado (20%), congestión en riñón (20%), hemorragias en riñón (10%) y hemorragias en pulmón (10%) (Figura 19).

Histopatología

Descripción macroscópica

En el estudio histopatológico algunos de los riñones enviados representativos de cada grupo presentaron congestión difusa, hemorragias, palidez y al corte se observó pérdida de la relación entre la corteza y la médula.

Descripción microscópica

Los fragmentos de riñón exhibieron grados variables de infiltrado inflamatorio, el cual estuvo compuesto principalmente por linfocitos, células plasmáticas y en menor cantidad histiocitos y neutrófilos. Asimismo, en algunas muestras se presentaron extensas áreas de congestión, degeneración tubular y en menor proporción fibrosis, dilatación tubular y necrosis (Cuadro 16).

Lesiones microscópicas en riñón

Se evaluaron las lesiones microscópicas en riñón con intervalo de confianza del 95% entre los grupos desafiados con la cepa LOCaS 46. En el grupo inmunizados con rGspD y desafiado se observó congestión (100%), necrosis (25%), inflamación (50%) glomérulo nefritis (50%), degeneración tubular (50%), fibrosis (25%) y otras lesiones (50%). En el grupo no inmunizado y desafiado se observó congestión (100%), necrosis (37.5%), inflamación (62.5%) glomérulo nefritis (62.5%), degeneración tubular (87.5%), fibrosis (50%) y otras lesiones (50%). En el grupo inmunizado con el inmunógeno comercial se observó congestión (100%), necrosis (25%), inflamación (75%) glomérulo nefritis (75%), degeneración tubular (100%), fibrosis (50%) y otras lesiones (75%), de los animales testigo no inmunizados y no desafiados se observó congestión (100%), no se observó necrosis, inflamación (25%) glomérulo nefritis (25%), degeneración tubular (100%), no se observó fibrosis y otras lesiones (25%), (Figura 20).

Cuadro 14 Resultados histopatológicos en riñones de hámsteres desafiados							
Número	Congestión Tubular	Degeneración Tubular	Inflamación	Fibrosis	Necrosis	Otras lesiones	
Grupo 1 Inmunizado con rGspD y desafiado							
H2	++	++	++ LO, CP. IN	+	+++	+ He Pt GL y Tb	
H3	+	-	-	-	-	-	
H4	++	-	-	-	-	-	
H6	+	+	+ PL	-	-	-	
Grupo 2 No inmunizado y desafiado							
H1	++	+++	++ LO, CP. IN	++	+	+ He + Atr GL Sg GL	
H2	+++	++	+ LO, CP. IN	-	-	+++ He Sg, Pt GL	
H3	+	++	++ NO.TB	+	+	Sg, Pt GL y Tb	
H4	+++	+++	+++ LO, CP. IN +++ NO, GL.	++	++	+ Atr GL Pt GL yTb	
H6	++	+	-	-	-	-	
H7	+	-	-	-	-	-	
H8	++	+	+ LO, CP. IN	-	-	-	
H9	+	+	-	+	-	-	
Grupo 3 Inmunizado con el inmunógeno comercial y desafiados							
H1	++	++	+ LO, CP. IN	-	-	-	
H2	+	+	+ LO, CP. IN	+	-	Sg, Pt GL	
H3	+	+	+++ LO, CP. IN	++	++	+ Atr GL Pt GL	
H4	+	+	-	-	-	-	
Grupo testigo no inmunizado-no desafiado							
H2	+	+	-	-	-	-	
H3	+	+++	+++ LO, CP. IN	-	-	-	
Grupo testigo inmunizado con GspD no desafiado H2							
H2	++	+	-	-	-	-	
H3	++	+	-	-	-	-	

Grados de lesión: + leve; ++ moderado; +++ grave.

Células inflamatorias: LO linfocitos; CP células plasmáticas; NO neutrófilos; HO histiocitos.

Localización: IN intersticial; PL pelvis; GL glomérulos; Tb túbulos.

Otras lesiones: He hemorragia; Atr atrofia; Sg sangre; Pt proteína.

1 2 3 4 5

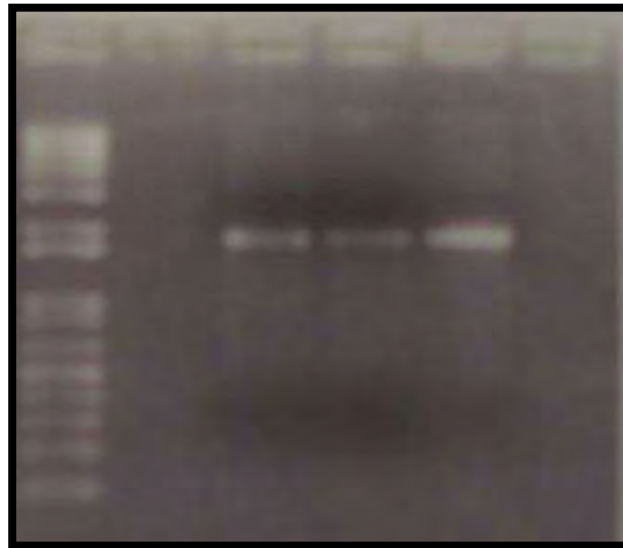


Figura 7 PCR de colonia. En la figura se muestra un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio de PCR utilizando los iniciadores BAP 1230 y BAP 1231. El carril 1 muestra el MPM, el carril 3 muestra el control positivo (*E. coli* Rosetta + plásmido pAL208) previamente detectado mediante Western blot utilizando anticuerpo monoclonal anti-T7-HRP y el carril 4 y 5 muestran las colonia elegidas que amplificaron para los iniciadores mencionados.

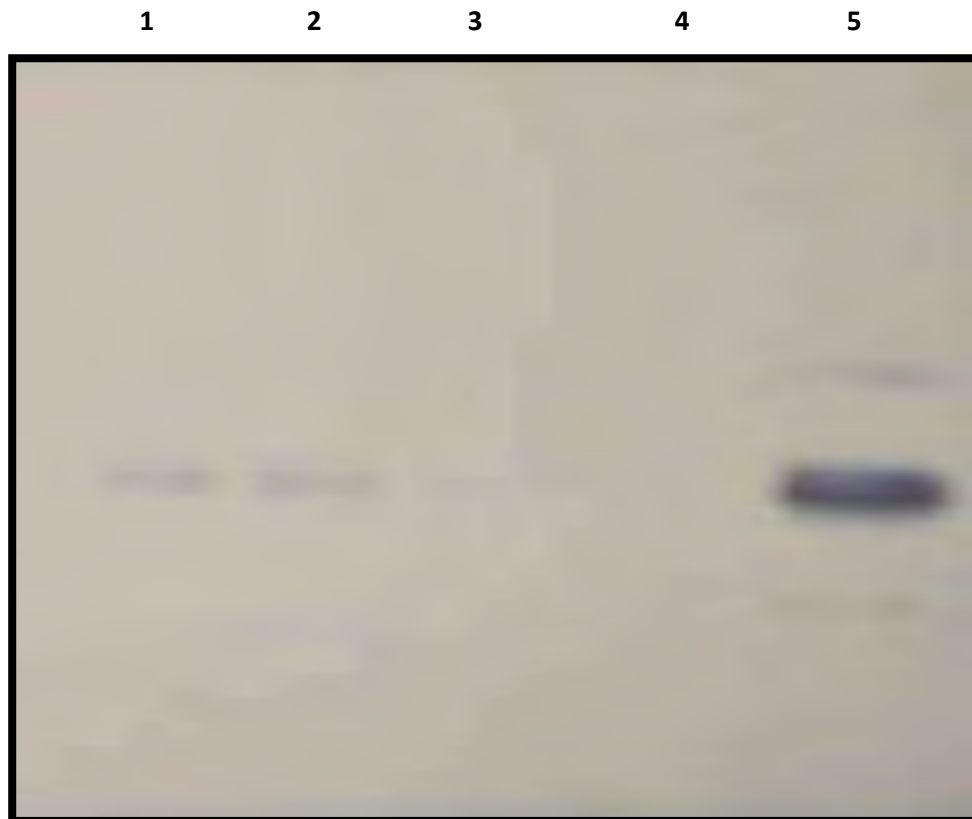


Figura 8 Inmonodetección tipo Wester blot utilizando anticuerpo monoclonal anti-T7-HRP. Se muestra una membrana de nitrocelulosa con bandas de rGspD purificada. En el carril 1, 2 y 3 muestran el sonicado de *E. coli* Rosetta con el plásmido pAL208 inducido con IPTG y purificado mediante electro-elusión. El carril 4 muestra el control negativo (sonicado de *E. coli* Rosetta con plásmido pET28a). El carril 5 muestra el control positivo (sonicado de *E. coli* Rosetta con plásmido pAL208)

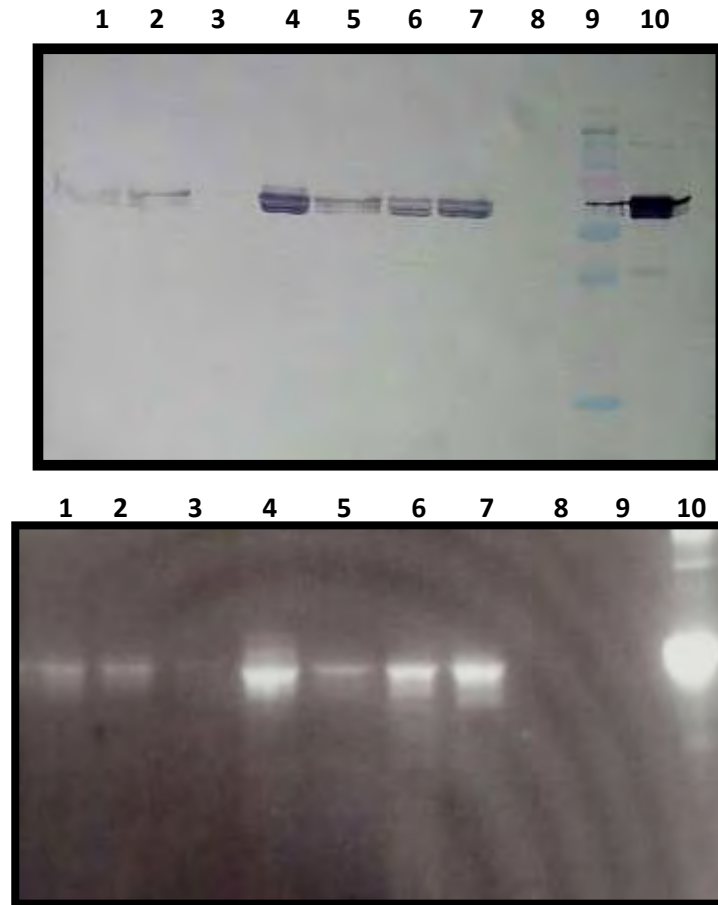


Figura 9 Bandas mostrando elusiones de rGspD correspondientes a 63 kDa. En la parte superior se muestra inmunodetección tipo Western blot con anticuerpo monoclonal anti-T7-HRP en una membrana de nitrocelulosa; los carriles del 1 al 7 muestran a rGspD purificada, el carril 8 muestra el control negativo (sonicado de *E. coli* Rosetta con plásmido pET28a), el carril 9 muestra el marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Standards-BIORAD), el carril 10 muestra el control positivo (sonicado de *E. coli* Rosetta con plásmido pAL208). En la parte inferior SDS-PAGE que muestra los carriles 1 al 7 corresponden a rGspD purificada, el carril 8 muestra el control negativo el mismo utilizado en la inmuno-transferencia y el carril 10 se utilizó albúmina sérica bovina (60 kDa) como indicador de peso molecular.

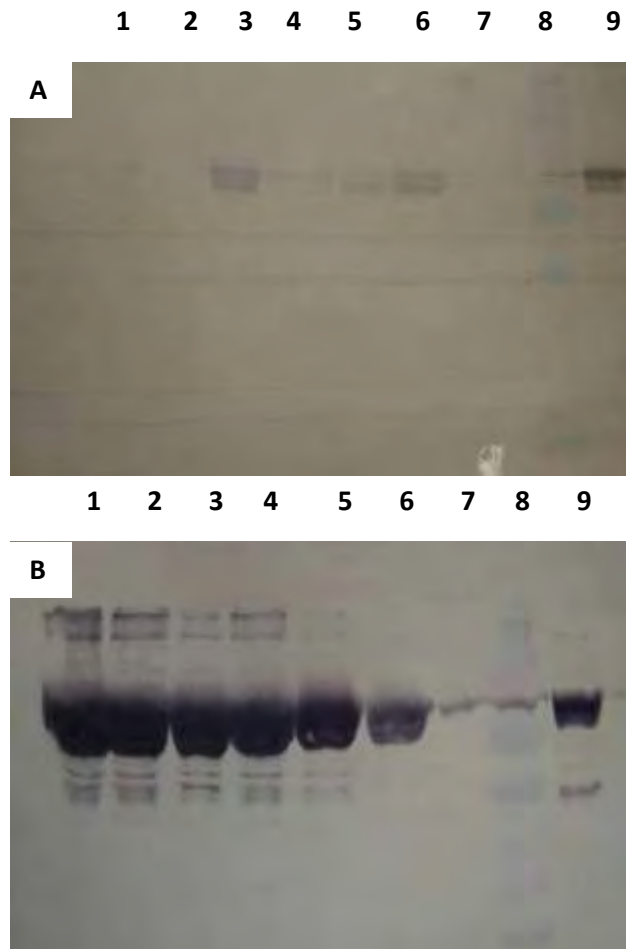


Figura 10 Comparación de bandas de la proteína purificada rGspD. Membrana de nitrocelulosa, la membrana **A** muestra bandas de proteína obtenidas con la técnica utilizada por Rodríguez-Reyes (2008), la membrana **B** muestra bandas obtenidas con las modificaciones en este trabajo. En ambas membranas los carriles 1-6 son bandas de la proteína purificada, el carril 7 muestra el control negativo (sonicado de *E. coli* Rosetta con plásmido pET28a), el carril 8 muestra el marcador de peso molecular (Protein Dual Color Standard-BIORAD). El carril 9 muestra el control positivo (sonicado de *E. coli* Rosetta con plásmido pAL208)

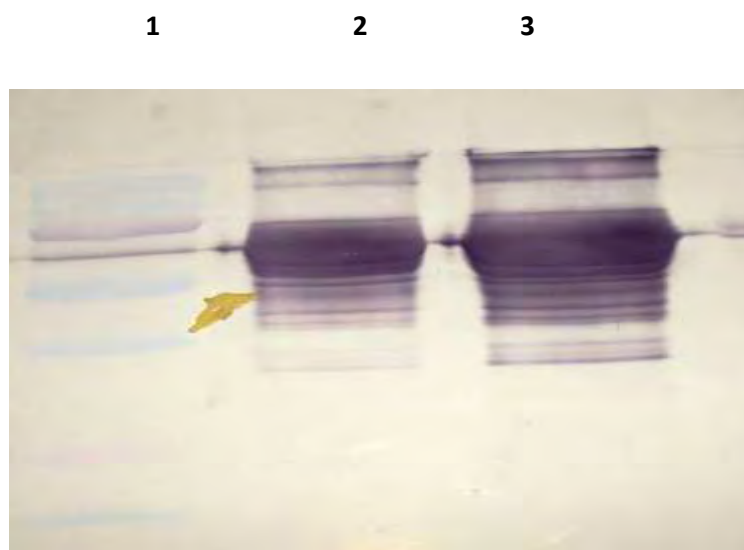


Figura 11 Inmunodetección tipo Western utilizando anticuerpo anti-GspD de conejo. Membrana de nitrocelulosa en el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular (Protein Dual Color Standard-BIORAD). Los carriles 2 y 3 muestran rGspD purificada.

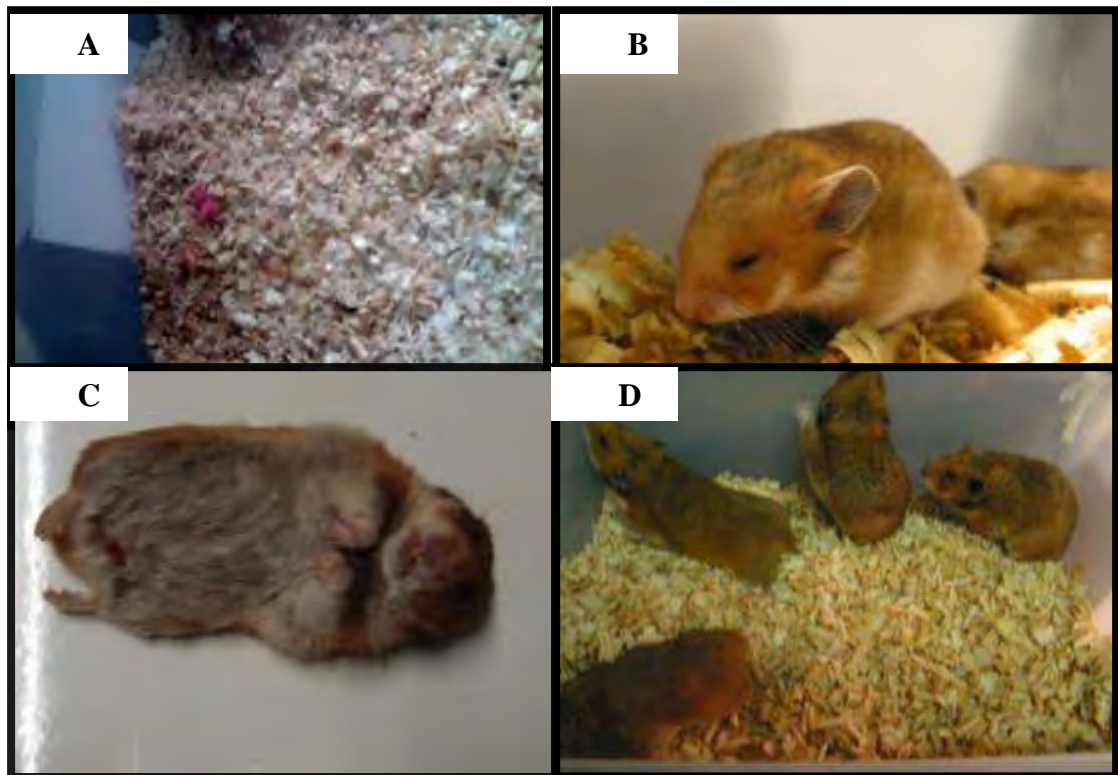


Figura 12 Signos de leptospirosis. En activación de la virulencia de la cepa LOCaS 46. **A** muestra hematuria en las camas de aserrín. **B** muestra a un hámster con los primeros signos de leptospirosis, se puede notar depresión y pelo hirsuto. **C** hámster muerto con signos de leptospirosis (hematuria). **D** muestra diferentes fases de leptospirosis incluyendo un hámster muerto.

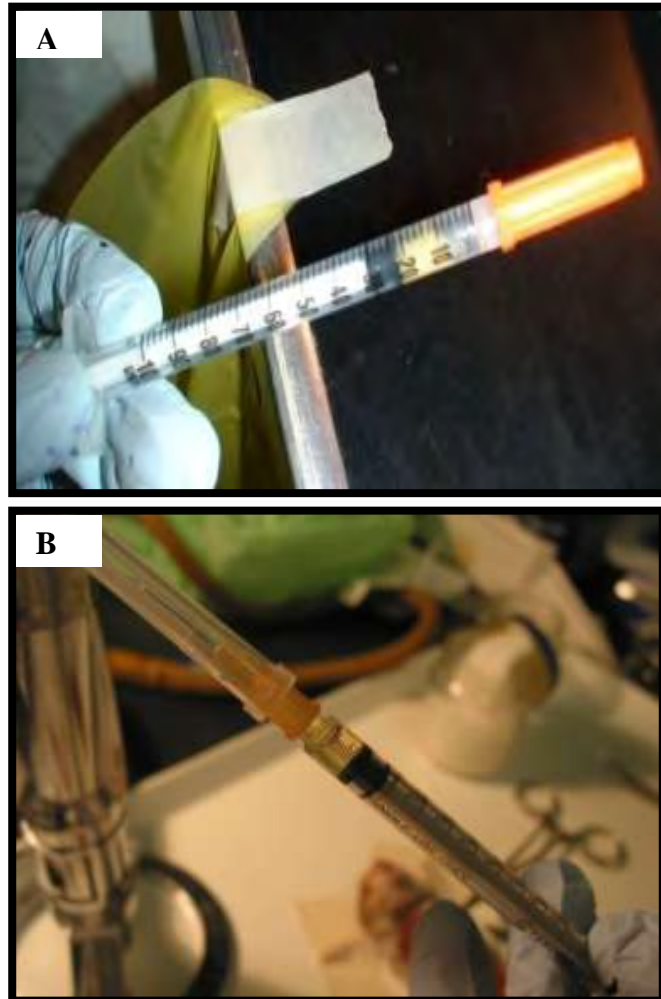


Figura 13 Comparación de orina de un hámster sano y un hámster con leptospirosis. A muestra orina de una hámster sano donde se aprecia un aspecto lechoso mientras que **B** muestra orina de un hámster con leptospirosis con falta de concentración que fue inoculado con 100 leptospiras del cultivo virulento de *L. interrogans* LOCaS 46 a los 9 días post inoculación.

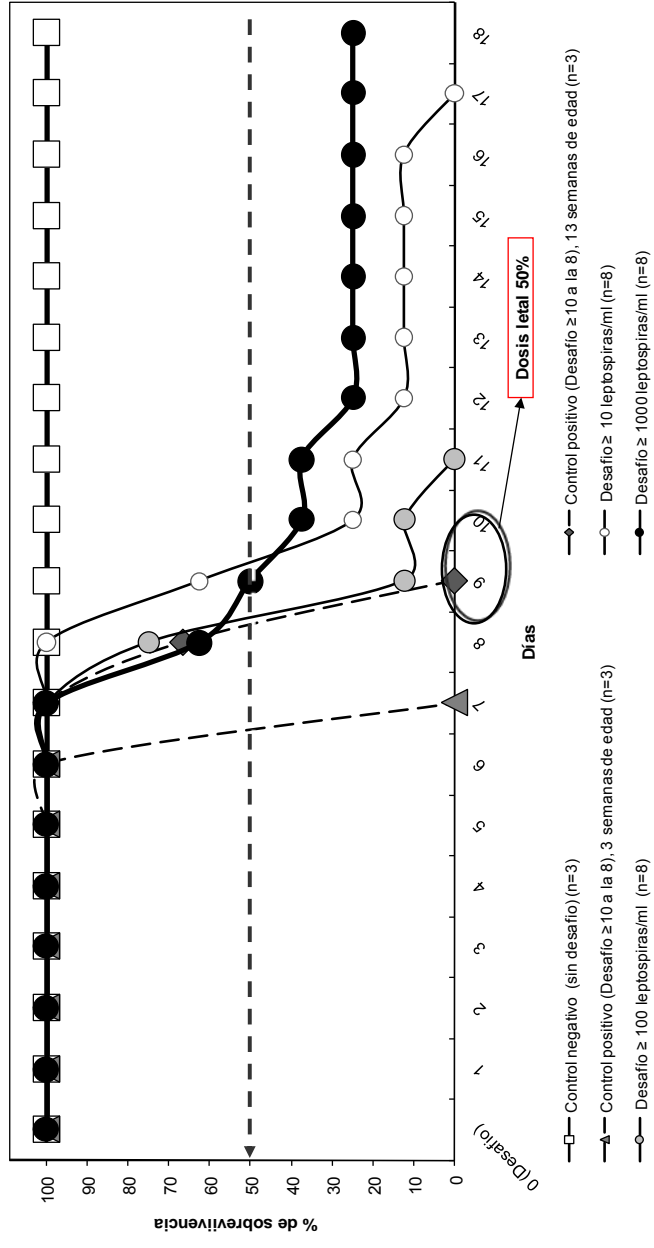


Figura 14 Curva de sobrevivencia en DL50% en hámsteres desafiados con el cultivo virulento de *L. interrogans* cepa LOCaS 46 aislado de canino pase 0 de infección previa en hámsteres.

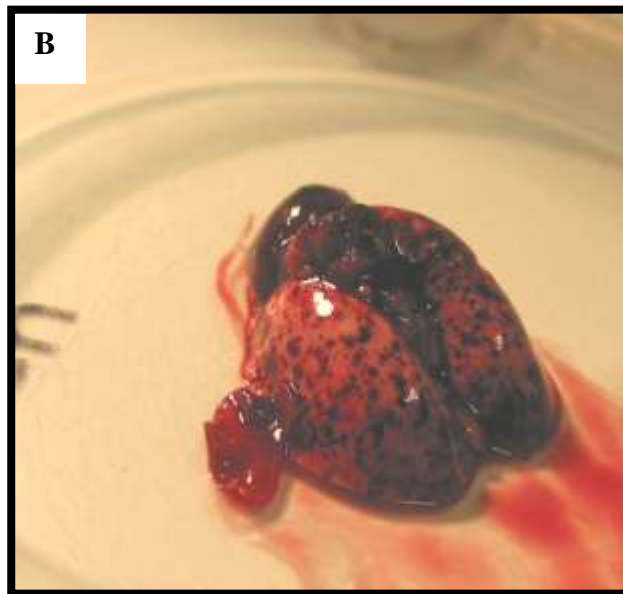


Figura 15 Comparación de apariencia macroscópica de un pulmón de hámster sano y un pulmón de hámster que murió por leptospirosis. A Pulmón de hámster aparentemente sano, sin lesiones macroscópicas aparentes. **B** Pulmón de hámster muerto por leptospirosis inoculado con la cepa de *L. interrogans* LOCaS 46, se muestran lesiones macroscópicas en tejido pulmonar como hemorragia multifocal.

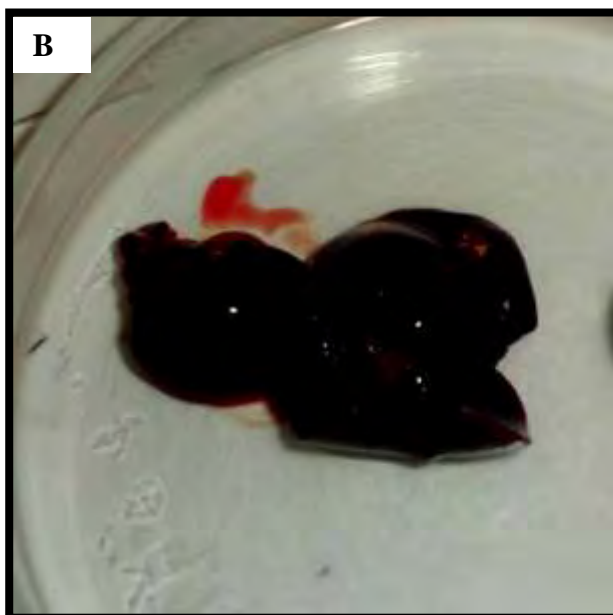


Figura 16 Lesiones macroscópicas de órganos de hámster muerto por leptospirosis inoculado con la cepa de *L. interrogans* LOCaS 46. A Riñones de hámster mostrando congestión difusa marcada. B Hígado se aprecia congestión y aumento de tamaño (bordes redondeados).

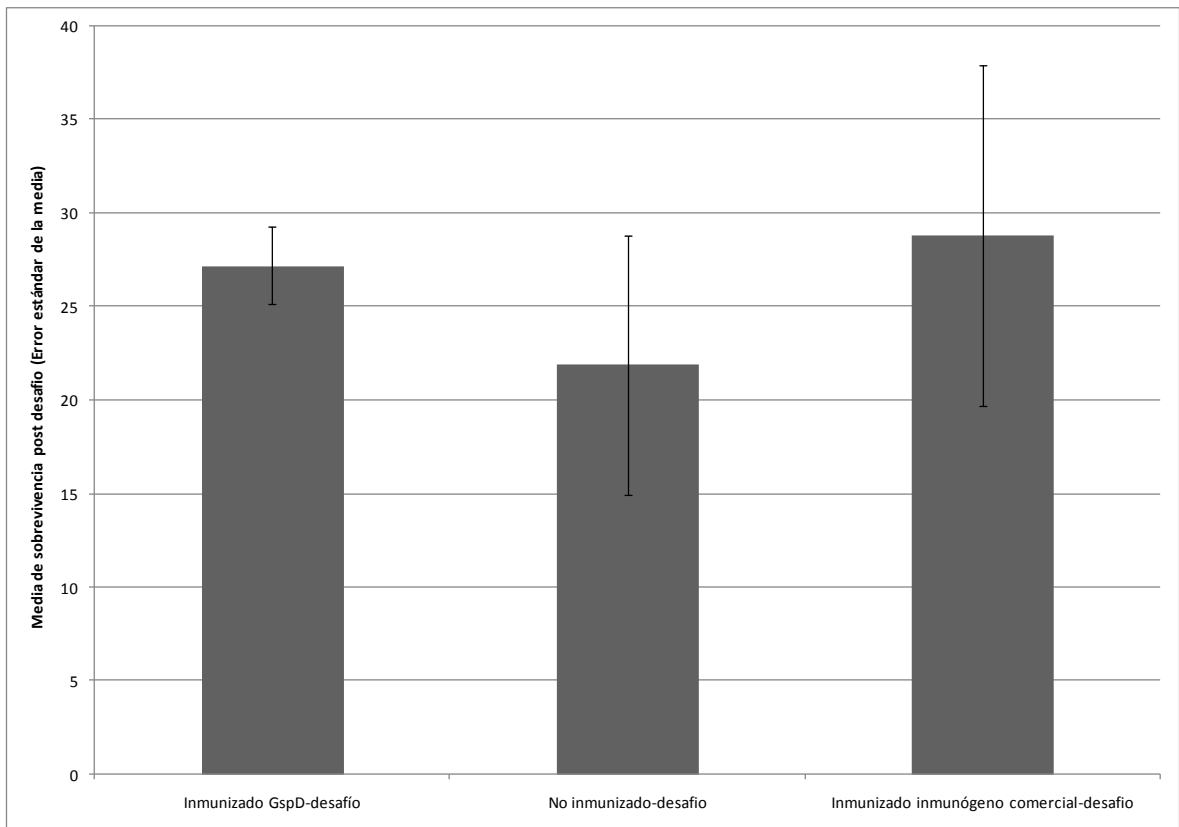


Figura 17 Media de sobrevivencia post desafío con aislado virulento de *L. interrogans* cepa LOCaS 46 en días por grupo. La media de sobrevivencia en el grupo inmunizados con la proteína rGspD y desafiado fue de 27.2 días, en el grupo no inmunizados y desafiado fue de 21.9 días, en el grupo inmunizados con el inmunógeno comercial y desafiado fue de 28.8 días. Sin diferencia estadística.

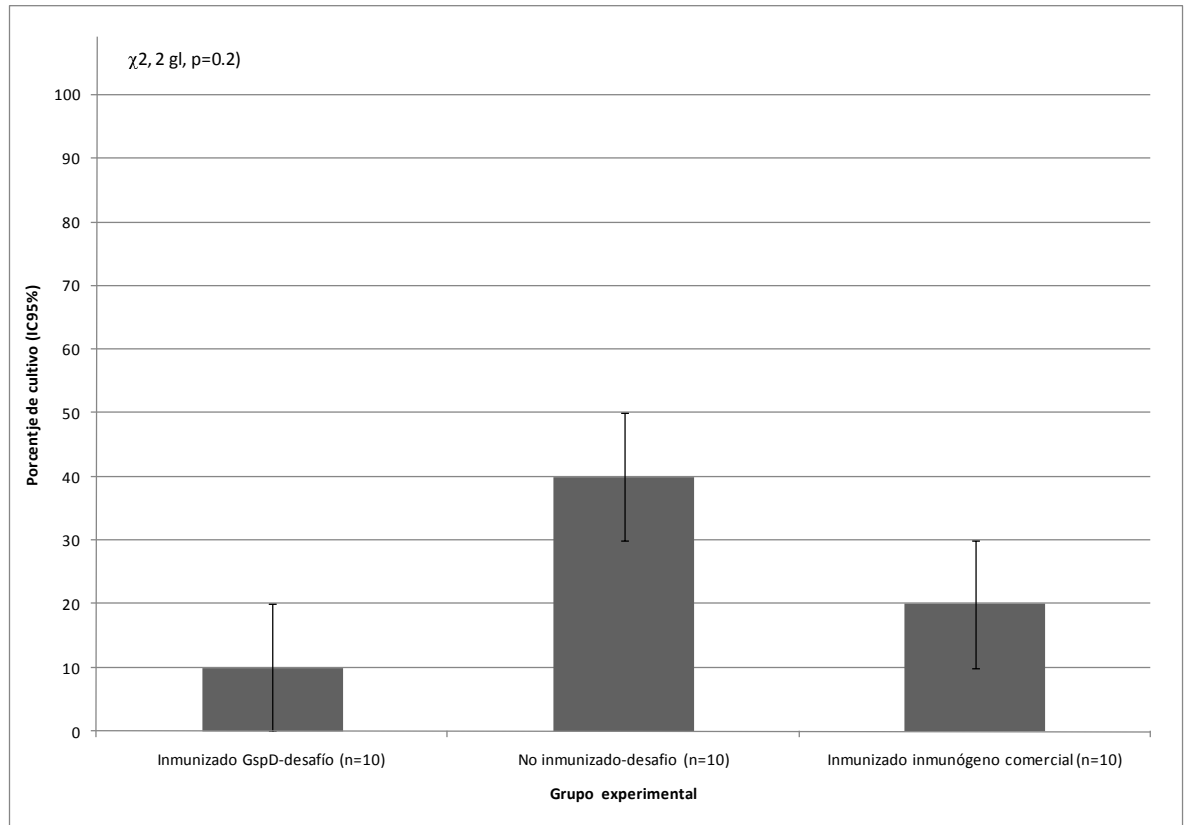


Figura 18 Porcentaje de cultivo. Con intervalo de confianza del 95%, en los grupos desafiados. Del grupo inmunizados con la proteína rGspD y desafiado se obtuvo el 10% de aislados, del grupo no inmunizados y desafiado se obtuvo el 40% de aislados, en el grupo inmunizados con el inmunógeno comercial y desafiado se obtuvo el 20% de aislado (p=0.2).

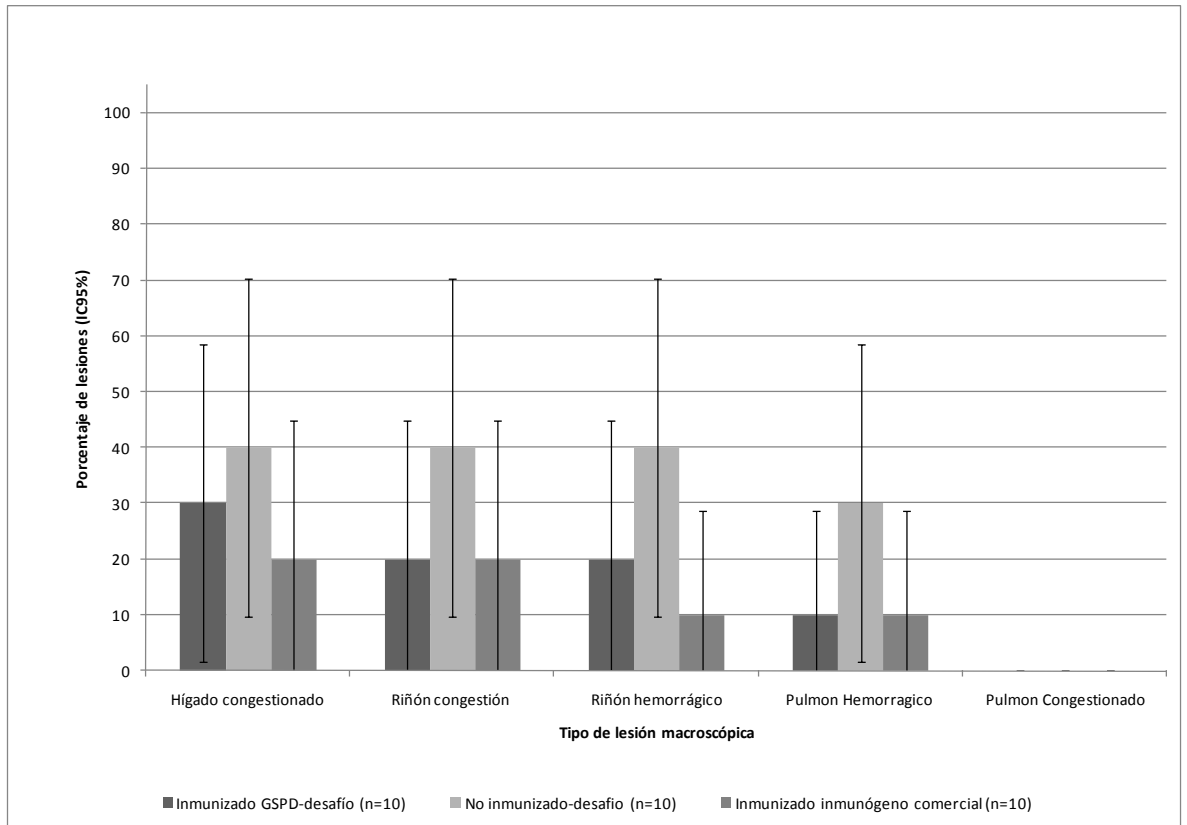


Figura 19 Porcentaje de lesiones macroscópicas. Con intervalo de confianza del 95% en Hígado, Riñón y Pulmón comparando entre los grupos Inmunizados con rGspD, con el inmunógeno comercial y grupo no inmunizado y posteriormente desafiados con el aislado virulento de *L. interrogans* cepa LOCaS 46.

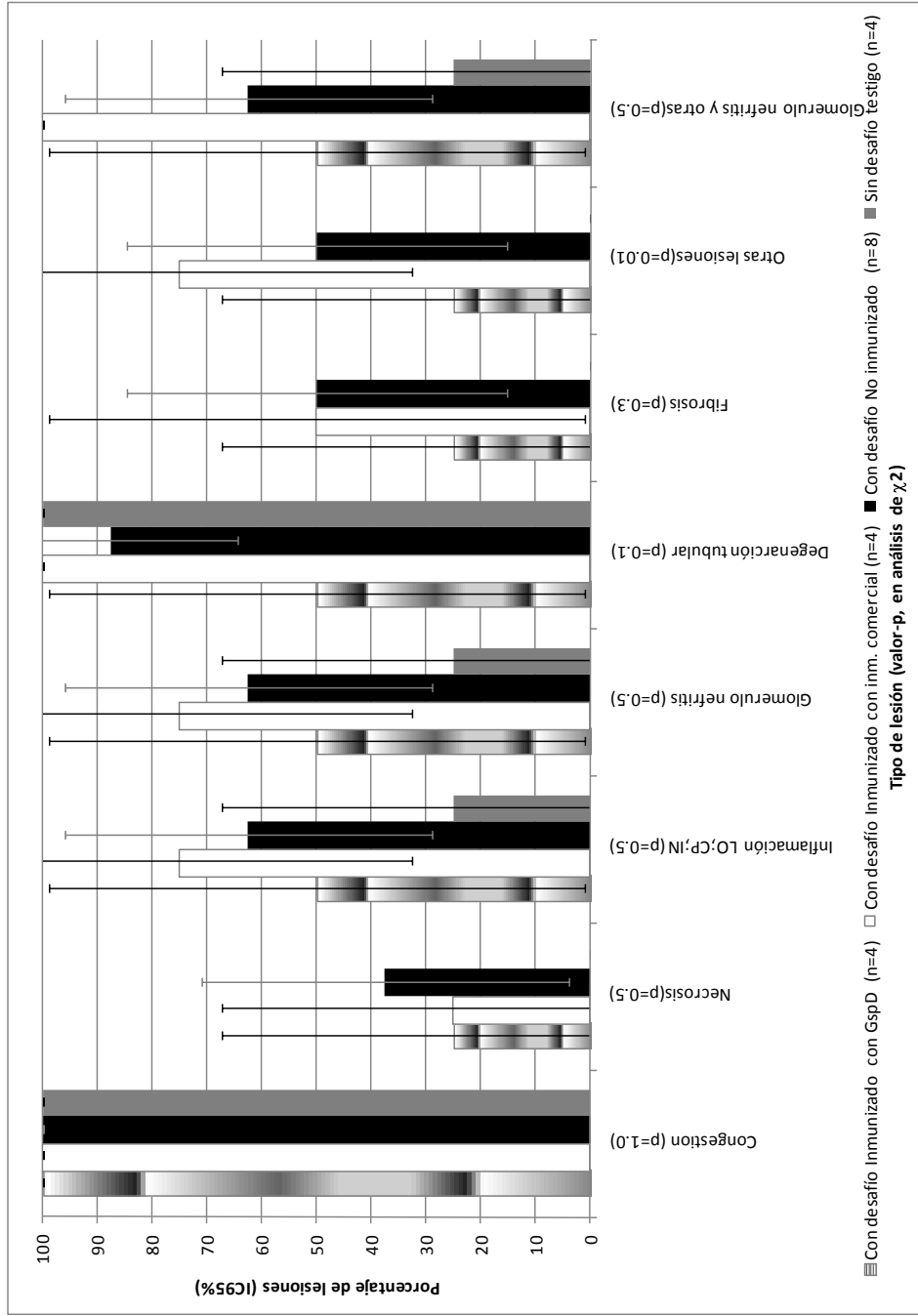


Figura 20 Porcentaje de lesiones microscópicas. Con intervalo de confianza del 95% en Hígado, Riñón y Pulmón comparando entre los grupos Inmunizados con rGspD, con el inmunógeno comercial y grupo no inmunizado y posteriormente desafiados con el aislado virulento de *L. interrogans* cepa LOCas 46.

8 DISCUSIÓN

En este trabajo no son concluyentes los resultados para determinar la protección generada por la proteína recombinante GspD para el ensayo de potencia. Aunque sí se observó un 80% de sobrevivencia en el grupo inmunizado con rGspD y desafiado, en contraste con el grupo testigo que presentó una sobrevivencia del 60%.

En el análisis estadístico se observó una mayor sobrevivencia en animales desafiados que previamente fueron inmunizados con la proteína recombinante GspD o con el inmunógeno comercial. Sin embargo, la media de sobrevivencia de estos grupos no fue estadísticamente diferente a la media de los animales que no fueron inmunizados y que también fueron desafiados. En porcentaje de cultivo, lesiones macroscópicas de los órganos evaluados e histopatología de riñón, se observan los mayores porcentajes en el grupo desafiado sin inmunización al ser comparados con los inmunizados; sin embargo, no fueron estadísticamente significativas. Aunque se observan más signos y lesiones características de leptospirosis en los animales no inmunizados y desafiados, el diseño experimental no cumple con la potencia estadística para demostrar la diferencia significativa entre grupos.

En la prueba de Aglutinación Microscópica (AM), realizada a los grupos de hámsteres inmunizados y desafiados, se consideraron muestras positivas a partir de un título de 1:100. Del grupo inmunizado con rGspD y desafiado se obtuvieron el 80% de los sueros de los hámsteres, en este grupo sólo se presentó un caso positivo (10%). Esto es esperado dado que la AM detecta aglutininas del tipo IgM dirigidas contra el LPS de *Leptospira*, componente ausente en los preparados de la proteína recombinante (rGspD). En el grupo no inmunizado y desafiado, no se presentaron títulos positivos en ninguno de los individuos de los cuales se pudo obtener muestra de suero (40%). El mayor número de reacciones positivas (30%), fueron obtenidas del grupo inmunizado con una bacterina comercial. En este grupo fue posible recolectar 80% de muestra de suero de los hámsteres y alcanzando títulos de hasta 1:12,800 contra la serovariedad Canicola. Este resultado puede ser debido a que, como se ha descrito anteriormente, la AM detecta principalmente anticuerpos dirigidos contra el LPS, por lo que es común encontrar respuestas en animales inmunizados con bacterinas de *Leptospira*. El inmunógeno comercial utilizado para inmunizar al grupo

testigo, incluía extractos de membranas de las serovariedades: Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae y Pomona. Es importante considerar que la AM no puede diferenciar entre anticuerpos producidos por la inmunización con el inmunógeno comercial o por exposición al agente (Adler and De la Peña-Moctezuma, 2009).

En la prueba de potencia, el número de leptospiras de la cepa de desafío no fue homogéneo en todos animales inoculados. Se tiene la hipótesis de que al realizarse el desafío a partir de medio semisólido Fletcher el agar contenido en este medio podría haber capturado a las leptospiras y esto impedir un número homogéneo de microorganismos para el desafío en los diferentes grupos de animales. Esto fue sustentado por el ensayo previo de determinación de la DL50%, el desafío se realizó a partir de medio líquido EMJH y la característica de este medio permitió una mejor homogenización lo cual dio un mayor control en el número de microorganismos presentes por dosis.

El establecimiento de modelos de enfermedad para resistencia y susceptibilidad a la enfermedad es importante en la investigación básica de leptospirosis (de Faria-Tucunduva *et al.*, 2007). La mayoría de las publicaciones en leptospirosis experimental se han enfocado en modelos para infecciones de tipo agudo en cuyos, hámsteres y ratones. Los ratones han sido usados para estudios de susceptibilidad genética de leptospirosis y este no es considerado un modelo ideal para ensayos de protección, las ratas son teóricamente un modelo ideal para explorar la resistencia que tienen estos animales a la enfermedad (de Faria-Tucunduva *et al.*, 2007). El hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) es un buen modelo animal en el estudio de leptospirosis ya que tiene un importante número de ventajas, incluyendo una excelente reproducibilidad de los resultados y una susceptibilidad a un amplio rango de cepas patógenas de *Leptospira* (van den Ingh y Hartman, 1986). La susceptibilidad de los hámsteres a la infección por leptospiras quizás esta relacionada con que estos animales han evolucionado en un hábitat desértico donde raramente se han expuesto a las condiciones húmedas que favorecen la transmisión de leptospirosis (Haake, 2006). Los signos clínicos y hallazgos patológicos en esta especie, son muy similares en la

infección experimental a la infección natural (Oliva *et al.*, 1994) por lo que se recomienda para un ensayo futuro de potencia.

El éxito del desafío requiere de la disponibilidad simultánea de los hámsteres y del cultivo virulento de *Leptospira*. Es importante contar con un número de animales del mismo sexo y de la misma edad. Los animales deben ser libres de infección por *Leptospira*, lo cual debe comprobarse utilizando la prueba de AM previa (Faine *et al.*, 1999). Regularmente, los hámsteres requieren de un periodo de adaptación previo al momento del experimento considerando una edad no mayor de 4 semanas para el día del desafío. Según Hakee (2006) y Barnett *et al* (1999) consideran que después de ésta edad son más resistentes, se ha observado que se puede incrementar la sobrevivencia en los desafíos aun con altas dosis de ciertas cepas, los animales que sobreviven al desafío pueden presentar una infección subletal, involucrando a los riñones principalmente. Es importante mantener altos niveles de virulencia para lograr un desafío de calidad, se puede recuperar el cultivo directamente de animales que se hayan ocupado para mantener la virulencia a animales susceptibles (Oliva *et al.*, 1994). Los cultivos de *Leptospira* requieren al menos una semana para su desarrollo, después de la inoculación en el medio de cultivo, sin embargo el desarrollo de leptospiras varia, dependiendo de la cepa y la calidad del medio (Haake, 2006).

Para prevenir contaminación entre grupos en experimentación durante el cambio de camas, los animales se deben mover directamente a cajas nuevas, nunca se deben compartir cajas entre grupos (Haake, 2006).

En un ensayo piloto de protección en hámsteres (n=3) realizado por Rodríguez-Reyes (2008) con la finalidad de determinar si existía alguna diferencia al desafío con la cepa virulenta LOCaS 46 correspondiente a la serovariedad Canicola, en cuanto al grado de lesión en un grupo previamente inmunizado con rGspD de serovariedad Hardjo y un grupo no inmunizado, se observó una supervivencia del 100% para el grupo que previamente fue inmunizado con rGspD, en contraste con el grupo testigo que tuvo una supervivencia del 33%, donde los animales presentaron lesiones que concordaban a las descritas a leptospirosis. Se pudo observar que la inmunización con la proteína recombinante evitó la muerte de los animales desafiados, así como la manifestación de la enfermedad. Sin

embargo, no evito la infección de dichos animales, la cual se demostró por observación microscópica en campo oscuro y aislamiento del microorganismo en riñón y orina.

Los hallazgos de Rodríguez-Reyes (2008) así como los de este trabajo dan indicio para la realización de un futuro ensayo de protección con la proteína rGspD donde se controlen los factores aquí propuestos.

En este ensayo utilizamos el adyuvante incompleto de Freund, el objetivo de utilizar los adyuvantes es que estas sustancias al mezclarse con un antígeno puede aumentar significativamente su inmunogenicidad, los adyuvantes pueden contener productos naturales como bacterias muertas o extractos de las mismas o algunas sales de aluminio. Casi todos actúan promoviendo la inflamación liberando lentamente el antígeno; favoreciendo la fagocitosis y la digestión enzimática de la molécula, de este modo amplifican la presentación y el reconocimiento de sus determinantes. Su acción principal es liberar lentamente el antígeno, con lo que se logra un estímulo continuo (García, 1997).

En ensayos posteriores, se sugiere probar el uso de otros tipos de adyuvantes como sales de aluminio, tres formas principales de esta sal con propiedades físicas y químicas diferentes se han descrito como adyuvantes importantes. Las sales de aluminio pueden formar compuestos solubles como los sulfatos o insolubles como los óxidos, los hidróxidos y los fosfatos de aluminio. Los primeros provocan agregación de las proteínas, mientras que los adyuvantes insolubles adsorben las proteínas y de este modo impiden su difusión. El uso de adyuvantes de aluminio es acompañado por la estimulación de IL-4 con estimulación de los Th2, con el aumento en la producción de IgG1 y IgE. Además de promover la inmunomodulación (Caulfield *et al.*, 2007).

El utilizar antígenos mezclados con sales de aluminio como adyuvante conduce a una mejor exposición de los determinantes antigénicos los cuales son fagocitados más fácilmente (García, 1997). Estas sales han sido utilizadas en ensayos de protección de proteínas recombinantes de *Leptospira* como LipL41-OmpL1 (Haake *et al.*, 1999) y LigA (Palaniappan *et al.*, 2006). El bacilo de Calmette Guérin (BCG) una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, tiene capacidad de actuar como adyuvante ya que estimula macrófagos, ha sido utilizado en estudios de protección con la proteína LipL32 de *Leptospira* (Seixas *et al.*, 2007). Sin embargo, al mezclarse la proteína con el adyuvante un

volumen considerable de proteína se pierde, por lo cual es necesario obtener una mayor cantidad de proteína al momento del ensayo de protección para solventar las pérdidas. También son necesarios ensayos con diferentes concentraciones de proteína ya sea en mayor o menor cantidad.

La inoculación intraperitoneal es la ruta estándar para desafío con leptospiras patógenas, la ventaja primaria de esta vía es la fácil liberación del inóculo, otras rutas de inoculación biológicamente relevantes incluyen la inoculación subcutánea (Truccolo *et al.*, 2002) y conjuntival (Bolin y Alt, 2001), éstas últimas vías deberán considerarse para estudios posteriores de protección con rGspD debido a que asemeja más la ruta de infección de forma natural.

El objeto del estudio de PMEs es identificar aquellas proteínas que son revelantes ya sea en la patogénesis o induciendo inmunidad en el huésped, hasta la fecha el método más directo disponible para evaluar estos puntos es determinar si la inmunización con dicha proteína es capaz de alterar la enfermedad en un modelo animal (Haake, 1999).

En esta investigación se logró la purificación de la proteína rGspD. Con las modificaciones realizadas en este ensayo se logró un método de purificación de más rendimiento. La estrategia resultó favorable para incrementar la cantidad de proteína purificada, lo cual se observó en la concentración y en la inmunodetección tipo Western blot con la presencia de una banda más prominente debido a la concentración. Se logró obtener una cantidad suficiente de proteína para la inmunización de los hámsteres para la rueba de potencia.

Para la purificación de la proteína rGspD se utilizó la técnica de electro-elusión, metodología utilizada por Rodríguez-Reyes (2008) a la cual se le realizaron importantes modificaciones. Las modificaciones realizadas en el presente trabajo se llevaron a cabo durante diferentes procesos.

1.- En la transformación de la cepa de *E. coli* con el plásmido recombinante (pAL208) para expresión y posterior purificación de rGspD, regularmente las colonias de *E. coli* recombinantes se congelaban a -70° C, en contraste a este ensayo se realizó la expresión con una recombinante de reciente transformación. Esto debido a que en algunos casos el

gen a ser expresado es tóxico para la célula aún cuando este no sea inducido (Ausubel *et al.*, 1996).

2.- Para la expresión de rGspD se incrementó el volumen del cultivo de *E. coli* conteniendo el plásmido pAL208 de 100 ml a un cultivo de 500 ml, esto con el fin de obtener una mayor cantidad de bacterias produciendo la proteína recombinante.

3.- Para la resuspensión de la pastilla del cultivo que se obtuvo de la expresión de *E. coli* recombinante se disminuyó la cantidad del PBS pH 7.2, para obtener un sonicado más denso.

4.- La concentración del amortiguador de muestra para la electroforesis en geles de poliacrilamida se manejó tres veces más concentrado, esto nos permitió cargar los geles utilizando una cantidad menor de amortiguador y una cantidad mayor de lisados de *E. coli* recombinante con el plásmido pAL208.

El método de electro-elusión es un procedimiento lento y laborioso que además es de bajo rendimiento. Sin embargo, con las modificaciones descritas resultó ser un método eficaz y se logró la cantidad necesaria para la inmunización de los hámsteres.

Las proteínas se pueden purificar de acuerdo a su solubilidad, tamaño, carga y afinidad (Matews *et al.*, 2002). Si bien el esquema de purificación de proteínas depende de muchas variables, incluyendo las propiedades de las proteínas de interés. La fusión de etiquetas en la secuencia de aminoácidos del vector de expresión facilita la expresión y purificación de las proteínas, tal es el caso de las etiquetas His•Tag (etiqueta de polihistidinas). La cromatografía de afinidad es una técnica que aprovecha las propiedades específicas de unión de proteínas, la característica distintiva de esta técnica es que el polímero está unido por enlaces covalente con algún ligando específico, las columnas con resina utilizan iones metálicos inmovilizados, como níquel (Ni^{+2}), que se une específicamente a la proteína deseada, las demás proteínas no se unen a la columna y se eliminan con facilidad. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en la purificación de una gran cantidad de proteínas de *Leptospira* tal es el caso OmpL1, LipL36, LipL41 (Barnett *et al.*, 1999).

Es necesario estandarizar un método eficaz que permita un rendimiento mayor de proteína. Muchos métodos de purificación han utilizado los sistemas pET. El plásmido utilizado para el constructo pAL208 (Rodríguez-Reyes *et al.*, 2008) fue el vector pET28a el cual codifica para una etiqueta de seis histidinas en la región C-terminal que al atravesar la columna que contiene la resina con níquel la proteína a purificarse es retenida en la columna. Sin embargo, esto no se ha logrado con GspD ya que al ser una proteína de 12 subunidades y de gran tamaño (63 kDa) posiblemente enmascara la etiqueta de histidinas. Por la cual se ha optado por otras versiones del vector como pET28b¹ que en su secuencia de aminoácidos codifica en sus regiones amino y carboxilo terminal la etiqueta de seis histidina, esto podría proporcionar una mayor afinidad y por lo tanto una mejor retención de la proteína a ser purificada ¹.

En esta investigación se determinó la DL50% en hámster mediante la técnica de Reed & Muench para la cepa LOCaS 46 de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola previamente aislada por el GrILLeP a partir de riñón de perro asintomático de la ciudad de México (Castillo-Sánchez, 2008), la cual resultó inferior a 10 leptospiras por el método de Reed & Muench sin embargo es necesario incrementar las diluciones para determinar el punto final 50%.

Si bien cada agente tiene una virulencia determinada, los resultados de este trabajo coinciden con los reportados por Haake y colaboradores (1999) con una cepa de *L. kirschneri* la cual fue inferior de 10 microorganismos para hámster. Una DL50% inferior a 9 microorganismos fue reportada por González y colaboradores (2003) para una cepa denominada 12399 de *L. interrogans* serogrupo Ballum serovariedad no identificada. No todas las cepas tienen la misma virulencia, puede haber variaciones entre serovariedades, Barnett y colaboradores (1999) reportan una DL50% inferior a 100 microorganismos para una cepa virulenta de *L. kirschneri* RM52.

¹ Novagen

9 CONCLUSIONES

- El grupo inmunizado con la proteína rGspD tuvo una sobrevivencia del 80 %, sin embargo, hacen falta estudios posteriores ya que en el grupo testigo la mortalidad causada por la cepa no fue satisfactoria, fue de 40%.
- En este ensayo se establecen los factores cruciales a considerar para realizar un ensayo posterior de protección con la proteína rGspD_L.
- Se lograron purificar 2.25 mg de rGspD_L mediante la técnica de electro-elución a la que se le realizaron modificaciones utilizando recombinantes de reciente transformación, incrementando el volumen de cultivo para transformación, disminuyendo la cantidad de PBS para resuspensión de la pastilla y utilizando un amortiguador de muestra de mayor concentración, lo cual dio como resultado un rendimiento mayor.
- En este estudio determinamos la dosis letal 50% (DL50) para la cepa patógena LOCaS 46 de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola la cual fue inferior a 10 leptospiras en hámster.

10 BIBLIOGRAFIA

- Acha P, Szyfres B. Zoonosis de las enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 29ª ed. Organización Panamericana de la Salud, 1986.
- Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol* 2009; ARTICLE IN PRESS.
- Alcaraz-Sosa LE. Detección de la expresión de la secretina GspD del sistema de secreción tipo 2 (T2SS) de *Leptospira* mediante inmunohistoquímica. (Tesis de Maestría). Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 2008.
- 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.
- Barnett JK, Barnett D, Bolin CA, Summers TA, Wagar EA, Cheville NF, Hartskeerl RA, Haake DA. Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. *Infect Immun* 1999; 67: 853-861.
- 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.
- Birbestein EL, Zee YC. *Tratado de Microbiología Veterinaria*. 2ª edición. España: Editorial Acribia S.A., 1990.
- Bitter W, Koster M, Latijnhouwers M, de Cock H and Tommassen J. Formation of oligomeric rings by XcpQ and PilQ, which are involved in protein transport across the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 1998; 27:209-219.
- Bitter W. Secretins of *Pseudomonas aeruginosa*: large holes in the outer membrane. *Arch Microbiol* 2003; 179: 307-314.
- Bolin AC, Prescott JF. Leptospirosis. In: Howard JL, Smith RA. *Current Veterinary Therapy*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1999: 325-358.
- Bolin CA, Alt DP. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. *Am J Vet Res* 2001; 62: 995-1000.
- Brooks GF, Botel JS, Morses A. *Microbiología Medica de Jawets*. Melnick y Adelberg. 18ª edición. México: El Manual Moderno, 2004; 332-336.
- Bulach DM, De la Peña MA, Adler B. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Leptospira*. *J Mol Microbial and Biotechnology* 2002; 2: 376-380.
- Burns D. Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6: 29-34.

Buttner D, Bonas U. Port of entry – the type III secretion translocon. *Trends Microbiol* 2002; 10:186–192.

Castillo-Sánchez SLO. Detección de perros portadores de leptospiras patógenas: estudio bacteriológico, serológico, histopatológico y molecular. (Tesis de Licenciatura). Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 2008.

Caulfield MJ, Shi L, Wang S, Wang B, Tobery TW, Mach H, Ahl PL, Cannon JL, Cook JC, Heinrichs JH, Sitrin RD. Effect of Alternative Aluminum Adjuvants on the Absorption and Immunogenicity of HPV16 L1 VLPs in Mice. *Human Vaccines* 2007; 3:139-146.

Christie PJ, Vogel JP. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol* 2000; 8: 354-360.

Cianciotto NP, Type II secretion system for all season. *Trend Microbiol* 2005; 13: 581-588.

Croda J, Figueira, C.P., Wunder Jr, EA, Santos CS, Reis MG, Ko AI, Picardeau M. Targeted mutagenesis in pathogenic leptospira: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. *Infect Immun* 2008; 76: 5826-5833.

Cullen PA, Haake DA, Adler B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiol Rev* 2004; 28: 291-318.

Cullen PA, Xu X, Matsunaga J, Sanchez Y, Ko AI, Haake DA, Adler B. Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infect Immun* 2005; 73: 4853-4863.

Danese PN, Silhavy TJ. Targeting and assembly of periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* 1998; 32: 59-94.

de Faria Tucunduva M, Athanazio DA, Gonçalves Ramos EA, Silva EF, Reis MG, Ko AI. Morphological alterations in the kidney of rats with natural and experimental *Leptospira* infection. *J Comp Pathol* 2007;137:231-238.

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.

Desvaux M, Parham NJ, Scott-Tucker A, Henderson IR. The autotransporter secretion system. *Trends Microbiol* 2004; 12: 306-309.

Doern GV. Detection of Select Bacteria. *Clin Infect Dis* 2000, 30; 166-73.

Doung F, Wickner W. The PrlA y PrlG phenotypes are caused by a loosened association among the translocase SecYEG subunits. *EMBO J* 1999; 15: 3263-3270.

Driessen AJM. SecB, a molecular chaperone with two faces. *Trends Microbiol* 2001; 9:193-196.

Economou A. Bacterial preprotein translocase: mechanism and conformational dynamics of a processive enzyme. *Mol Microbiol* 1998; 27: 511-518.

Erosa B A. Leptospirosis. Historia de la Medicina Sociedad Yucateca de Historia y Filosofía de Medicina, Mérida, Yucatán, México. Rev Biomed 2001;12:282-287.

Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. 2a. Ed. Melbourne, Australia: Medi Sci 1999.

Fajardo E M, Ortiz B, Chávez A, Gaínza N, Izquierdo L, Hernández Y, Labrador I, Álvarez E. Normalización de la dosis letal 50 % de cepas de *Leptospira interrogans* utilizadas en el control de la vacuna antileptospirósica cubana para uso humano. Rev Cubana de Med Trop 1998; 50: 22-26.

Farr RW. Leptospirosis. Clin Infect Dis 1995; 21: 1-6.

Farrar WE. Especies de *Leptospira* (Leptospirosis). En Mandell G L, Douglas R G, Bennet J E. Enfermedades Infecciosas. Principios y Prácticas. Tomo II. 3º edición. Argentina. Editorial medica Panamericana, 1991:1916-1920.

Filloux A. The underlying mechanisms of type II protein secretion. Biochim Biophys Acta 2004; 1694: 163–179.

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.

García TF. Fundamentos de inmunobiología. 1ª edición. UNAM. México, 1997.

González PB, Dreyfus G. Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: Biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. Mensaje Bioquímico 2003; 27: 45-63.

González RA, Rodríguez JY, Batista SN, Valdés AY, González GM. Caracterización microbiológica de cepas candidatas vacunales de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum. Rev Cubana Med Trop 2003; 55: 146-152.

Greenberg EP, Canale PE. Relationship between cell coiling and motility of spirochetes in viscous environments. J Bacterial 1977;131:960-969.

Guerreiro H, Croda J, Flannery B. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. Infect Immun 2001;69:4598-4968.

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.

- 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.
- Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* 2000, 68: 2276-2285.
- Haake DA, Martinich C, Summers TA, Shang ES, Pruetz JD, McCoy 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.
- 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.
- Haake DA. Hamster model of leptospirosis. Author manuscript; available in PMC 2009.
- Haake D, Matsunaga J. Commentary. Leptospiral membrane proteins- variations on a theme?. *Indian J Med Res* 2005; 121:143-145.
- Hagan WA, Bruner DW. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. 2° edición. México: La prensa Medica Mexicana 1961:418-429.
- Hamburger ZA, Brown MS, Isberg RR, Bjorkman PJ. Crystal structure of invasins: a bacterial integrin-binding protein. *Science* 1999;286:291-295.
- Henderson IR, Nataro JP. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* 2001;69:1231-1243.
- Hull, R. A., R. E. Gill, P. Hsu, B. H. Minshew, and S. Falkow. Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or Dmannose resistant pili from a urinary tract infection *Escherichia coli* isolate. *Infect Immun* 1981;33:933-938.
- Isogai E, Isogai H, Fujii N, Oguma K. Macrophage activation by leptospiral lipopolysaccharide. *Zentralblatt für Bakteriologie* 1990;273:200-208.
- Johnson TL, Abendroth J, Hol WGJ, Sandkvist M. Type II secretion: from structure to function. *FEMS Microbiol Lett* 2006;255:175-186.
- Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews Microbiology* 2009;7:736-747.
- Kohler R, Schafer K, Muller S, Vignon G, Diederichs K, Philippsen A, Ringler P, Pugsley AP, Engel A, Welte W. Structure and assembly of the pseudopilin PulG. *Mol Microbiol* 2004;54:647-664.
- Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.

Lee SH, Kim S, Park SC, Kim MJ. Cytotoxic activities of *Leptospira interrogans* hemolysin SphH as a pore-forming protein on mammalian cells. *Infection and Immunity* 2002;70:315-322.

León-Lara L. Epidemiología, prevención y control de la leptospirosis en los animales domésticos. En: Rodríguez VRI. Enfermedades de importancia económica en producción animal. México: McGraw-Hill, 2005: 489-504.

Letoffe S, Delepelaire P, Wandersman C. Protein secretion in Gram-negative bacteria: assembly of the three components of ABC protein-mediated exporters is ordered and promoted by substrate binding. *EMBO J* 1996; 15: 5804–5811.

Levett P. Leptospirosis. *Clin Micro Rev* 2001;14:296-326.

Mathews CK, Holde VKE, Ahern GK. Bioquímica. 3ª ed. Madrid España. Pearson, Addison Wesley. 2002.

Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sanchez Y, Siqueira I, Bolin CA, Reis MG, Riley LW, Haake DA, Ko AI. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microbiol* 2003;49:929-945.

Matsunaga J, Young TA, Barnett JK, Barnett D, Bolin CA, Haake DA. Novel 45-kilodalton leptospiral protein that is processed to a 31- kilodalton growthphase-regulated peripheral membrane protein. *Infect Immun* 2002;70:323-334.

McBride AJ, Cerqueira GM, Suchard MA, Moreira AN, Zuerner RL, Reis MG, Haake DA, Ko A I, Dellagostin OA. Genetic diversity of the leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. *Infect Genet Evol* 2008;9:196-205.

Mena-Bañuelos R. Análisis *in silico* de los genes *gspDL* y *gspEL* del sistema de secreción tipo-II de *Leptospira biflexa* serovariedad Patoc (Tesis de Maestría) Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 2006.

Michel G, Bleves S, Ball G, Lazdunski A, Filloux A. Mutual stabilization of the XcpZ and XcpY components of the secretory apparatus in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol* 1998;144:3379-3386.

Mini-PROTEAN II electrophoresis cell instruction manual (BIO-RAD); 3-20

Myers, M., Manual de Métodos para el diagnostico de laboratorio de la leptospirosis OPS. 1985, Centro Panamericano de Zoonosis.

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, Degraive 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.

Noguchi H. *Leptospira Icteroides* and Yellow Fever. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1920;6:110-111.

Nouwen N, Stahlberg H, Pugsley AP, Engel A. Domain structure of secretin PulD revealed by limited proteolysis and electron microscopy. EMBO J 2000;19:2229-2236.

Office International des Epizooties [OIE]. Leptospirosis. Institute for International Cooperation in Animal Biologics. 2005;1-7.

Oliva R, Infante JF, González M, Perez V, Sifontes S, Marrero O, Valdés Y, Fariñas M, Esteves L, González I. Pathologic-clinical characterization of leptospirosis in a golden Syrian hamster model. Arch Med Res 1994;25:165-170.

Palaniappan RU, McDonough SP, Divers TJ, Chen CS, Pan MJ, Matsumoto M, Chang YF, 2006. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. Infect Immun 2006;74:1745-1750.

Planet PJ, Kachlany SC, DeSalle R, Figurski DH. Phylogeny of genes for secretion NTPases: identification of the widespread *tadA* subfamily and development of a diagnostic key for gene classification. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2001;98:2503-2508.

Pugsley AP, Francetic O, Possot OM. 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.

Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. E.U.A.: Blackwell Publishing, 2002:175-179.

Radolf JD. Role of outer membrane architecture in immune evasion by *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi*. Trends Microbiol 1994;2:307-311.

Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. Medicina Veterinaria. Tratado de las Enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9ª edición. España: Mc Graw-Hill Interamericana, 1999;1:1150-1164.

Rance BL. Leptospirae. In: Hirsh DC, Mc Lachlan NJ, Walker RL. Veterinary Microbiology. 2ª ed. E.U.A. Blackwell Publishing, 2004:185-188.

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.

Requisitos mínimos para las bacterinas empleadas en la prevención y control de la leptospirosis bovina. Norma Oficial Mexicana (NOM-038-ZOO-1995).

Rodríguez-Reyes A. Expresión of *gspD_L* de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjobovis) en *E. coli*, (Tesis de Doctorado) Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 2008.

Ruer S, Stender S, Filloux A, Bentzmann S. Assembly of Fimbrial Structures in *Pseudomonas aeruginosa*: Functionality and Specificity of Chaperone-Usher Machineries. *J Bacteriol* 2007; 189: 3547-3555.

Saiz SJJ. Contribución al estudio de la incidencia de Leptospirosis en ganado bovino. (Tesis de licenciatura) Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1962.

Sambrook J, Fritsh Ef, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2º. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Sandkvist M. Biology of type II secretion. *Mol Microbiol* 2001,40:271-283.

Sandkvist M. Type II secretion and pathogenesis. *Infect and Immun* 2001,69:3523-3535.

Sapriel G, Wandersman C, Delepelaire P. The SecB chaperone is bifunctional in *Serratia marcescens*: SecB is involved in the Sec pathway and required for HasA secretion by the ABC transporter. *J Bacteriol* 2003,185:80-88.

Sauer FG, Remaut H, Hultgren SJ, Waksman G. Fiber assembly by the chaperone-usher pathway. *Biochim Biophys* 2004;1694:259-267.

Seixas F, Fagonde É, Drawanz D, Cerqueira G, Amaral M, Fagundes M, Grando R, Antonio O. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protect hamsters from challenge. *Vaccine* 2007, 26:88-95.

Sonnier 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* 2000;19:86-94.

Stathopoulos C, Hendrixson DR, Thanassi DG, Hultgren S, St. Geme WJ, Curtiss R.

Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in Gram-negative pathogens: an evolving story. *Microb and Infect* 2000;2:1061-1072.

Thanassi DG, Hultgren SJ. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Cell Biol* 2000;12:420-430.

Truccolo J, Charavay F, Merien F, Perolat P. Quantitative PCR assay to evaluate ampicillin, ofloxacin, and doxycycline for treatment of experimental leptospirosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:848-853.

Vado SI, Cardenas MMF, Jiménez DB, Alzina LA, Laviada MH, Suárez SV, Zavala VJE. Clinical-Epidemiological study of leptospirosis in humans and reservoirs in Yucatán, México. *Rev Inst Med Trop* 2002;244:335-340.

van den Ingh TS, Hartman EG. Pathology of acute *Leptospira interrogans* serotype *icterohaemorrhagiae* infection in the Syrian hamster. *Vet Microbiol* 1986; 12:367-376.

Varela G, Roch E. Leptospirosis en la República Mexicana. *Rev Salud Pública de México* 1965;2:189-193.

Varela G, Vázquez A, Mancera L. Investigación de aglutininas para *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *L. pomona* y *L. canicola* en sueros humanos y de animales, de diversos Estados de la República Mexicana. *Rev Inst Salubr Enferm trop (Méx.)* 1958;18:31-35.

Wang Z, Jin L, Wegrzyn A. Leptospirosis vaccines. *Microb Cell Fact* 2007;11: 6:39.

WHO, ILS. Human Leptospirosis Guidance for diagnosis surveillance and control. NML classification: WC 420, 2003; 9-16.

APÉNDICE 1 SOLUCIONES Y MEDIOS

Soluciones para expresión de proteínas

Medio de cultivo LB (Luria Bertani) (Sambrook, 1989)

Reactivo	1000 ml	500 ml	300 ml	100 ml
Bacto triptona (Difco)	10 g	5 g	3 g	1 g
Extracto de levadura ¹	5 g	2.5 g	1.5 g	0.5 g
Cloruro de sodio (NaCl ²)	5 g	2.5 g	1.5 g	0.5 g
Hidróxido de sodio (NaOH) 1N	1 ml	0.5 ml	0.3 ml	0.1 ml
Bacto agar (Merck) si es necesario	10-15 g	5-7 g	3-4.5 g	1-1.5 g

Disolver en aproximadamente $\frac{3}{4}$ de la cantidad necesaria de agua destilada cada uno de los componentes, agitar hasta disolver totalmente y aforar con agua destilada hasta el total de la cantidad requerida. Esterilizar en autoclave a 15 lbs durante 15 minutos.

Antibióticos

Sulfato de Kanamicina	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
-----------------------	----------------------------

El sulfato de kanamicina es diluido en agua bidestilada, posteriormente filtrado a través de membranas estériles calibre 0.22 μm (*Millipore*TM) y posteriormente es almacenado a 4° C hasta su uso.

Cloranfenicol	34 $\mu\text{g}/\text{ml}$
---------------	----------------------------

El cloranfenicol es diluido en etanol al 100%, posteriormente se filtra a través de membranas estériles calibre 0.22 μm (*Millipore*TM) y posteriormente es almacenado a 4° C hasta su uso.

¹ Dibico

² JT Baker

Solución de IPTG (Isopropil-β-d-tiogalactósido) 1M

IPTG (Promega) (PM=238.3)	2.3 g
Agua bidestilada	10 ml

El IPTG se disuelve en agua bidestilada estéril, se ajusta al volumen final y posteriormente se filtra a través de membranas estériles calibre 0.22 μm (*Millipore*TM), se distribuye en volumen de 1 ml y es almacenado a 4° C hasta su uso.

PBS (Solución amortiguadora de fosfatos)

Cloruro de Sodio ¹ (NaCl)	8 g
Cloruro de potasio ² (KCl)	0.2 g
Fosfato de sodio anhidro ² (Na ₂ HPO ₄)	1.44 g
Fosfato de potasio monopotásico ² (KH ₂ PO ₄)	0.24 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver en aproximadamente 800 ml de agua destilada cada uno de los componentes, agitar hasta disolver totalmente y aforar con agua destilada a 1000 ml, ajustar el pH a 7.4 con ácido clorhídrico (HCl 10 M). Esterilizar en autoclave a 15 lbs durante 15 minutos.

Soluciones para electroforesis en geles de poliacrilamida

Amortiguador de Muestra (4X)

Reactivo	Cantidad
Tris ³ -HCl pH 6.8 (0. 5M)	2 ml
Glicerol (JT Baker)	5 ml
SDS ³ 10%	2 ml
2-Mercaptoetanol (Sigma)	1 ml
Azul de bromofenol (Merk)	0.02 g

Disolver los componentes en un tubo falcón de 15 ml y cubrir de la luz con papel aluminio.

1 Golden bell

2 Gibco BRL

3 Invitrogen

Amortiguador para electroforesis en poliacrilamida (5X)

Tris base ¹	15 g
Glicina ²	72 g
SDS ²	5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver en aproximadamente 800 ml de agua destilada los componentes, agitar hasta disolver totalmente y aforar con agua destilada a 1000 ml, ajustar el pH a 8.3 con ácido clorhídrico (HCl 10 M), posteriormente almacenar a 4° C hasta su uso.

Nota: Para ser utilizado por electroforesis se diluye a 1X: con 200 ml del amortiguador de electroforesis (5X) y 800 ml de agua destilada.

Solución de Azul de Coomassie

Metanol absoluto ³	500 ml
Ácido Acético ¹	100 ml
Agua bidestilada	500 ml
Azul de coomassie ⁴	0.55 g

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

Nota: Esta solución puede ser utilizada en varios procesos de tinción de geles de poliacrilamida.

Solución desteñidora de Azul de Coomassie

Metanol absoluto ³	500 ml
Ácido Acético ¹	100 ml
Agua bidestilada	500 ml

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

1 JT BAKER

2 Invitrogen

3 Alit Reactivos analíticos

4 BIORAD

Geles de poliacrilamida para electroforesis

Gel separador al 12%

Agua destilada	3350 μ l
Tris HCL pH 8.8 (1.5 M)	2500 μ l
SDS 10%	100 μ l
Archilamida (en solución-BIORAD)	4000 μ l
Persulfato de amonio	50 μ l
TEMED ² (Tetrametiltiléndiamina)	5 μ l

Se mezclan los componentes, se recomienda añadir el TEMED hasta el final ya que junto con el persulfato de amonio catalizan la polimerización del gel. Posteriormente se coloca la mezcla en la base para preparación de geles de la cámara de electroforesis, eliminar las burbujas que se formen en la superficie del gel, esto se logra agregando una cantidad mínima de agua destilada o etanol al 70%, se deja polimerizar por aproximadamente 40 minutos.

Gel concentrador al 4%

Agua destilada	3000 μ l
Tris ¹ HCL pH 6.8 (0.5 M)	1250 μ l
SDS ² 10%	50 μ l
Acrilamida ³ (en solución BIORAD)	700 μ l
Persulfato de amonio ¹	25 μ l
TEMED ² (Tetrametiltiléndiamina)	5 μ l

Se mezclan los componentes igual que el gel separador se recomienda añadir el TEMED al final, posteriormente se coloca la mezcla en la base para preparación de geles de la cámara de electroforesis por encima del gel separador, eliminar las burbujas que se formen en la superficie del gel absorbiéndolas con una micropipeta de 1000 μ l y se colocan los peines para la formación de los pozos, se deja polimerizar por aproximadamente 20 minutos.

1 JT BAKER

2 Invitrogen

Tris HCL pH 8.8 (1.5 M)

Tris ¹ HCL pH 8.8 (1.5 M)	54.45 g
Agua destilada	300 ml

Disolver el Tris en 150 ml de agua destilada, ajustar el pH a 8.8 con HCL y aforar a 300 ml con agua destilada.

Tris HCL pH 6.8 (1.5 M)

Tris ¹ HCL pH 6.8 (0.5 M)	6 g
Agua destilada	100 ml

Disolver el Tris en 50 ml de agua destilada, ajustar el pH a 6.8 con HCL y aforar a 100 ml con agua destilada.

Solución de persulfato de amonio

Persulfato de amonio ¹ (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	0.5 g
Agua destilada	500 µl

Disolver el persulfato de amonio en agua destilada se recomienda prepararlo al momento.

SDS al 10%

SDS ²	10 g
Agua destilada	100 ml

Se disuelve el SDS en 50 ml de agua destilada y posteriormente se afora a 100 ml con agua destilada.

1 JT BAKER

2 Invitrogen

Soluciones para inmunodetección tipo Western blot

Amortiguador de Towbin

Tris ¹	3.023 g
Glicina ²	14.4 g
SDS ²	0.037 g
Metanol absoluto ³	200 ml
Agua destilada	1000 ml

Disolver en aproximadamente 600 ml de agua destilada los componentes excepto el metanol, agitar hasta disolver totalmente y aforar con agua destilada a 800 ml, almacenar a 4° C hasta su uso. Al momento de ser utilizado se agrega el metanol absoluto frío.

Amortiguador TBS (Amortiguador Salino de Tris)

Tris ¹ HCL 1M pH 8.0	20 ml
Cloruro de sodio ² (NaCl)	1.8 g
Agua destilada	180 ml

Disolver cada uno de los componentes totalmente y almacenar a 4° C hasta su uso.

Amortiguador TBS-T (Amortiguador Salino de Tris-Tween 20)

Tris ¹ HCL 1M pH 7.5	10ml
Cloruro de sodio ² (NaCl)	0.9 g
Tween 20 ³	50 µl
Leche descremada (Svelty)	5 g
Agua destilada	90 ml

Disolver los componentes totalmente y almacenar a 4° C hasta su uso

1 JT BAKER

2 Invitrogen

3 Alit Reactivos analíticos

Elusión de proteínas

Solución de Cloruro de Potasio (250 mM)

Cloruro de potasio ¹ (KCl PM=74.557)	3.72 g
Agua destilada	200 ml

Disolver totalmente el cloruro de potasio en agua destilada y almacenar a 4°C hasta su uso.

Amortiguador de elusión (5X)

Tris base ¹	15 g
Glicina ²	72 g
SDS ²	5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver en aproximadamente 800 ml de agua destilada los componentes y aforar con agua destilada a 1000 ml, ajustar el pH a 8.3 con ácido clorhídrico (HCl 10 M), posteriormente almacenar a 4°C hasta su uso.

Nota: Al momento de realizar electro-elusión preparar el amortiguador de corrida a 1X con 200 ml del amortiguador de corrida (5X) y 800 ml de agua destilada. No se debe utilizar este amortiguador para otra electro-elusión se recomienda preparar nuevo en cada procedimiento.

Soluciones para electroforesis en gel de poliacrilamida

Solución TAE (Tris-Acetato-EDTA) 50X pH 8.5

Tris ¹	60.5 g
Ácido acético glacial ¹	14.27 ml
EDTA 0.5M ³	25 ml
Agua destilada	250 ml

1 JT BAKER

2 Invitrogen

3 Sigma-ALDRICH

Disolver en 150 ml de agua destilada los componentes y aforar con agua destilada a 250 ml, ajustar el pH a 8.5 y posteriormente almacenar a 4° C hasta su uso.

Solución TAE

Solución TAE 50X	20 ml
Agua destilada	980 ml

Disolver la solución TAE 50X en agua destilada y homogenizar perfectamente.

Gel de agarosa

Agarosa ¹	0.3 g
Solución TAE de trabajo	30 ml

Se disuelve la agarosa con la cantidad requerida de solución TAE de trabajo, se calienta en el horno de microondas hasta que la mezcla se vea transparente, posteriormente se le agrega bromuro de etidio 5 µg/ µl y se coloca en la cámara de electroforesis para geles de agarosa se recomienda eliminar las burbujas, se coloca el peine según las muestras a correr, se deja polimerizar por aproximadamente 30 minutos.

Amortiguador de muestra para ADN bacteriano

Sucrosa	1.9 g
EDTA ²	0.124 g
Azul de bromofenol ³	5 mg
Agua bidestilada	5 ml

Disolver los componentes en un tubo falcón de 15 ml.

1 Invitrogen

2 JT BAKER

3 Merck

Medios de cultivo para el desarrollo de *Leptospira*

Medio Fletcher

Peptona	0.3 g
Extracto de carne (Bioxon)	0.2 g
Cloruro de sodio ¹ (NaCl)	0.5 g
Agar (Merk)	1.5 g
Agua destilada	920 ml
Suero de conejo esteril	5-10 %

Se mezclan todos los componentes a excepción del suero de conejo, esterilizar en autoclave a 15 lbs durante 15 minutos, posterior a la esterilización se deja enfriar un poco y se le agrega el suero de conejo en condiciones de esterilidad. El suero de conejo es previamente filtrado con membranas de 0.22 μm e inactivado a 56° C durante 30 minutos. El suero se mezcla con los componentes y se distribuye en tubos estériles con una cantidad aproximada de 4-5 ml según el alto del tubo.

Solución para prueba de aglutinación microscópica

SAF (Solución salina Amortiguadora de Fosfatos)

Solución amortiguadora de Sorensen (de Stock)

Reactivo	Cantidad
Fosfato disodico anhidro ² (Na ₂ HPO ₄)	8.33 g
Fosfato monopotasio ² (KH ₂ PO ₄)	1.09 g
Agua bidestilada	1000 ml

Solución salina fisiológica (Stock)

Cloruro de sodio ¹ (NaCl)	8.5 g
Agua destilada	1000 ml

¹ Golden Bell

² J T BAKER

La solución SAF se prepara mezclando 40 ml de la solución amortiguadora de Sorensen y 460 ml de la solución salina fisiológica. El pH final debe ser de 7.2-7.4, se esteriliza a 121° C durante 15 minutos, se distribuye y se almacena a temperatura ambiente.

Medio EMJH

1.- Base para medio

Reactivo	Cantidad	Stock
Fosfato de sodio ¹ (NaHPO ₄)	1 g	
Fosfato monopotásico ¹ (KH ₂ PO ₄)	0.3 g	
Cloruro de sodio ² (NaCl)	1 g	
Cloruro de amonio (Na ₄ Cl)	1 ml	2.5 g/ 10 ml
Piruvato de sodio	1 ml	1 g/ 10 ml
Glicerina 10%	1 ml	1 ml/ 10 ml
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	0.7 ml	0.15 g/ 10 ml
Sulfato de zinc (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	1.0 ml	0.04 g/ 10 ml
Sulfato de manganeso (MnSO ₄ ·4H ₂ O)	1.0 ml	0.01 g/ 10 ml
Tiamina	1.0 ml	0.05 g/ 10 ml
Cloruro de magnesio (MgCl)	0.7 ml	0.15 g/ 10 ml
Glicerol 20%	1.0 ml	2 ml/ 10 ml
Vitamina B12 (Cianocobalamina)	0.2 ml	0.02 g/ 10 ml
Sulfato cúprico (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	1.0 ml	0.03 g/ 10 ml
Piruvato de sodio	0.2 g	
Acetato de sodio anhidro (CH ₃ COONa)	0.1 g	
Fracción V de albúmina bovina en polvo	10.0 g	

1 J T Baker

2 Golden Bell

Inicialmente se prepara la base del medio disolviendo los componentes en 600 ml de agua destilada estéril y aforando a 800 ml se homogeniza completamente y se le adiciona la solución Tween 80-sulfato ferroso.

Tween 80	12.5 ml
Sulfato ferroso (FeSO ₄)	0.01g

Se mezclan los componentes en 60 ml de agua destilada estéril y se homogeniz, se agrega a la base y se vuelve a homogenizar. Se ajusta el pH de 7.2-7.4, posteriormente se filtra con prefiltro¹ en condiciones de no esterilidad, después con membrana de 0.65 μm^1 , 0.45 μm^1 , 0.22 μm^1 . Finalmente se filtrar con membrana 0.22 μm^1 en condiciones de esterilidad. Se incuba a 37° C para prueba de esterilidad por aproximadamente 24 horas.

¹ (Millipore™)

APÉNDICE 2 BASE DE DATOS

DOSIS LETAL 50%: Identificación, inoculación, día de muerte, lesiones en órganos.

Cons	Grupo	H	Inoculación	Muerte	Día	Hígado congestión	Riñón congestión	Pulmón congestión
1	C+ 3S	H1	28-02-08	06-03-08	7	1	0	0
2	C+ 3S	H2	28-02-08	06-03-08	7	1	0	0
3	C+ 3S	H3	28-02-08	06-03-08	7	1	0	0
4	C+13S	H1	28-02-08	07-03-08	8	1	0	0
5	C+13S	H2	28-02-08	07-03-08	8	2	2	0
6	C+13S	H3	28-02-08	08-03-08	9	1	0	0
7	C-	H1	28-02-08	17-03-08	18	0	0	0
8	C-	H2	28-02-08	17-03-08	18	0	0	0
9	C-	H3	28-02-08	17-03-08	18	0	0	0
10	10	H1	28-02-08	08-03-08	9	2	3	0
11	10	H2	28-02-08	08-03-08	9	1	2	0
12	10	H3	28-02-08	08-03-08	9	2	2	0
13	10	H4	28-02-08	09-03-08	10	2	3	0
14	10	H5	28-02-08	09-03-08	10	2	2	0
15	10	H6	28-02-08	09-03-08	10	2	2	0
16	10	H7	28-02-08	11-03-08	12	2	3	0
17	10	H8	28-02-08	17-03-08	18	0	0	0
18	100	H1	28-02-08	07-03-08	8	2	2	0
19	100	H2	28-02-08	07-03-08	8	2	2	0
20	100	H3	28-02-08	08-03-08	9	2	3	0
21	100	H4	28-02-08	08-03-08	9	2	3	0
22	100	H5	28-02-08	08-03-08	9	2	2	0
23	100	H6	28-02-08	08-03-08	9	2	2	0
24	100	H7	28-02-08	08-03-08	9	2	2	0
25	100	H8	28-02-08	10-03-08	11	1	0	0
26	1000	H1	28-02-08	06-03-08	7	3	3	0
27	1000	H2	28-02-08	06-03-08	7	1	2	0
28	1000	H3	28-02-08	06-03-08	7	3	3	0
29	1000	H4	28-02-08	07-03-08	8	2	3	0
30	1000	H5	28-02-08	08-03-08	9	2	2	0
31	1000	H6	28-02-08	12-03-08	13	2	2	0
32	1000	H7	28-02-08	17-03-08	18	0	0	0
33	1000	H8	28-02-08	17-03-08	18	0	0	0

BASE DE DATOS

DOSIS LETAL 50%: Identificación y lesiones en órganos.

Cons	Hígado hemorragias	Pulmón hemorragias	Hígado congestión binario	Riñón congestión binario	Riñón Hemorragias binario	Pulmón hemorragias binario
1	0	2	1	0	1	1
2	0	1	1	0	1	1
3	0	1	1	0	1	1
4	0	3	1	0	1	1
5	0	3	1	1	1	1
6	0	3	1	0	1	1
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	1	1	1	1	1
11	0	3	1	1	1	1
12	0	3	1	1	1	1
13	0	2	1	1	1	1
14	0	2	1	1	1	1
15	0	2	1	1	1	1
16	0	3	1	1	1	1
17	0	0	0	0	0	0
18	0	2	1	1	1	1
19	0	2	1	1	1	1
20	0	3	1	1	1	1
21	0	3	1	1	1	1
22	0	3	1	1	1	1
23	0	3	1	1	1	1
24	0	3	1	1		1
25	0	2	1	0	1	1
26	0	3	1	1	1	1
27	0	3	1	1	1	1
28	0	3	1	1	1	1
29	0	2	1	1		1
30	0	3	1	1	1	1
31	0	2	1	1	1	1
32	0	0	0	0	0	0
33	0	0	0	0	0	0

BASE DE DATOS

PRUEBA DE POTENCIA Identificación, inoculación, días de sobrevivencia .

Consecutivo	Grupo	Grupo	Hámster	Inoculación	Días sobrevivencia
1	1	Inm-GspD-Des	H1	08-09-08	10
2	1	Inm-GspD-Des	H2	08-09-08	22
3	1	Inm-GspD-Des	H3	08-09-08	30
4	1	Inm-GspD-Des	H4	08-09-08	30
5	1	Inm-GspD-Des	H5	08-09-08	30
6	1	Inm-GspD-Des	H6	08-09-08	30
7	1	Inm-GspD-Des	H7	08-09-08	30
8	1	Inm-GspD-Des	H8	08-09-08	30
9	1	Inm-GspD-Des	H9	08-09-08	30
10	1	Inm-GspD-Des	H10	08-09-08	30
11	2	No Inm-Des	H1	08-09-08	9
12	2	No Inm-Des	H2	08-09-08	9
13	2	No Inm-Des	H3	08-09-08	10
14	2	No Inm-Des	H4	08-09-08	11
15	2	No Inm-Des	H5	08-09-08	30
16	2	No Inm-Des	H6	08-09-08	30
17	2	No Inm-Des	H7	08-09-08	30
18	2	No Inm-Des	H8	08-09-08	30
19	2	No Inm-Des	H9	08-09-08	30
20	2	No Inm-Des	H10	08-09-08	30
21	3	Inm-inmunógeno com	H1	08-09-08	18
22	3	Inm-inmunógeno com	H2	08-09-08	30
23	3	Inm-inmunógeno com	H3	08-09-08	30
24	3	Inm-inmunógeno com	H4	08-09-08	30
25	3	Inm-inmunógeno com	H5	08-09-08	30
26	3	Inm-inmunógeno com	H6	08-09-08	30
27	3	Inm-inmunógeno com	H7	08-09-08	30
28	3	Inm-inmunógeno com	H8	08-09-08	30
29	3	Inm-inmunógeno com	H9	08-09-08	30
30	3	Inm-inmunógeno com	H10	08-09-08	30
31		No Inm-No Des.	H2		
32		No Inm-No Des.	H3		
33		Inm GspD-No Des	H2		

BASE DE DATOS

PRUEBA DE POTENCIA: Identificación, día de muerte, cultivo de órganos.

Consecutivo	Muerte	Muerte	Hígado EMJH	Hígado Fletcher	Riñón EJMH	Riñón Fletcher
1	18-09-08	M	0	0	0	0
2	30-09-08	M	0	0	0	0
3	08-10-08	S	0	0	0	0
4	08-10-08	S	0	0	0	0
5	08-10-08	S	0	0	0	0
6	08-10-08	S	0	0	0	0
7	08-10-08	S	0	0	0	0
8	08-10-08	S	0	0	0	0
9	08-10-08	S	0	0	0	0
10	08-10-08	S	0	0	0	0
11	17-09-08	M	0	0	0	0
12	17-09-08	M	0	0	0	0
13	18-09-08	M	1	1	0	0
14	19-09-08	M	0	0	0	0
15	09-10-08	S	0	0	0	0
16	09-10-08	S	0	0	0	0
17	09-10-08	S	0	0	0	0
18	09-10-08	S	0	0	0	0
19	09-10-08	S	0	0	0	0
20	09-10-08	S	0	0	1	0
21	26-09-08	M	0	0	0	0
22	09-10-08	S	1	0	0	1
23	09-10-08	S	0	0	0	0
24	09-10-08	S	0	0	0	1
25	10-10-08	S	0	0	0	0
26	10-10-08	S	0	0	0	0
27	10-10-08	S	0	0	0	0
28	10-10-08	S	0	0	0	0
29	10-10-08	M				
30	10-10-08	S	0	0	0	0
31	21-10-08	S			0	0
32	21-10-08	S	0	0		
33	21-10-08	S	0	0	0	0

BASE DE DATOS

PRUEBA DE POTENCIA Identificación, cultivo y lesiones en órganos.

Consecutivo	Orina EMJH	Orina Fletcher	Sangre EMJH	Cultivo	Hígado congestión	Riñón congestión	Pulmón congestión
1				0	1	1	0
2	1	0		1	1	1	0
3		0		0	1	0	0
4	0			0	0	0	0
5	0	0		0	0	0	0
6				0	0	0	0
7				0	0	0	0
8				0	0	0	0
9				0	0	0	0
10				0	0	0	0
11	0	0		0	2	2	0
12	1	1	1	1	2	2	0
13	0	1		1	2	3	0
14	0	1		1	1	1	0
15	0	0		0	0	0	0
16	0	0		0	0	0	0
17	0	0		0	0	0	0
18	0	0		0	0	0	0
19	0	0		0	0	0	0
20	0	0		1	0	0	0
21				0	2	1	0
22				1	0	0	0
23				0	0	0	0
24				1	0	0	0
25				0	0	0	0
26				0	0	0	0
27				0	0	0	0
28				0	0	0	0
29				0	1	1	0
30	0	0		0	0	0	0
31				0	0	0	0
32				0	0	0	0
33				0	0	0	0

BASE DE DATOS

PRUEBA DE POTENCIA Identificación y lesiones en órganos.

Consecutivo	Hígado hemorragia	Pulmón hemorragias	Hígad o congestión binario	Riñón congestión binario	Riñón hemorragias binario	Pulmón hemorragias binario
1	0	0	1	1	1	0
2	0	1	1	1	1	1
3	0	0	1	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
11	0	2	1	1	1	1
12	0	2	1	1	1	1
13	0	3	1	1	1	1
14	0	0	1	1	1	0
15	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0
21	0	1	1	1	1	1
22	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0
29	0	0	1	1	0	0
30	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0
33	0	0	0	0	0	0