



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

**“COMPARACIÓN DE LA  
ORGANIZACIÓN GENÉTICA DE LOS  
LOCI *gsp* EN 2 CEPAS DE *Leptospira  
interrogans* SEROVARIEDAD  
CANICOLA”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**MVZ. LILIANA ORDÓÑEZ LÓPEZ**

**TUTOR:**

**DR. ALEJANDRO DE LA PEÑA-MOCTEZUMA**

**COMITÉ TUTORAL:**

**DR. EDMUNDO CALVA MERCADO**

**DR. ALFREDO SAHAGÚN RUIZ**

**MÉXICO, D.F.**

**2010**



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.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio del Grupo de Investigación en *Leptospira* y Leptospirosis (GrILLeP) del Departamento de Microbiología e Inmunología perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr Alejandro de la Peña Moctezuma.

El proyecto se realizó con apoyo del Proyecto PAPIIT IN222806 comprendido en el periodo de Febrero del 2007 a Enero del 2009.

La alumna fue becaria del CONACYT con número de registro 218099.

## **DEDICATORIA**

### **A mis padres:**

Jorge y María Eugenia, por su confianza, enseñanzas, consejos, cariño incondicional, por guiarme por el buen camino y por enseñarme el valor de la familia. Los quiero.

### **A mis hermanos:**

Jorge y Claudia Patricia, por estar siempre presentes en las buenas y en las malas y por compartir tantos momentos tan bonitos desde que éramos niños.

### **A Gerardo:**

Por compartir su vida a mi lado, brindarme su amor y confianza y alentarme a ser una mejor persona.

### **A mis amigos:**

Carlos, Rocío, Pamela, Napoleón, Cristina, y a todos los que vivieron a mi lado esta etapa, a todos ustedes gracias por sus palabras de ánimo, consejos y por ofrecerme su amistad en todo momento.

A "Skio" y "Doggie"

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de formarme y crecer tanto académicamente como personalmente.

A mi tutor, Dr Alejandro de la Peña Moctezuma, por la confianza, apoyo y paciencia que tuvo durante estos años.

A mi comité tutorial, integrado por el Dr. Alfredo Sahagún Ruiz y el Dr. Edmundo Calva Mercado, por el tiempo invertido en cada reunión y por creer en este proyecto de investigación.

Al jurado de mi examen, por el tiempo invertido en la revisión de tesis y por los comentarios proporcionados para mejorar su edición final: Dr Francisco Suárez Guemes, Dr Rogelio A. Alonso Morales, Dra Susana Elisa Mendoza Elvira y Dr Jorge I. Torres Barranca

A la Dra María Alejandra Ayanegui Alcérreca, por siempre brindarme su apoyo, consejos, confianza, palabras de aliento y por sus aportaciones a la escritura de esta tesis. Gracias Ale.

A todos los profesores de posgrado, por colaborar en mi formación académica y por compartir sus conocimientos.

A mis compañeros, amigos y doctores del Departamento de Microbiología que de alguna y otra forma colaboraron y me apoyaron a lo largo de mi estancia en el departamento, Raúl Segura Candelas, Fabiola Rodríguez Mijangos, Dra Cristina Rodríguez Sánchez, Dr Roberto Cervantes Olivares, Dr Antonio Verdugo, Dra Xochitl Vega, Pablo, Miriam, Raúl, Alfredo, Jesús Sotomayor.

Al Dr E. Armando Rodríguez Reyes por iniciarme en la microbiología, y por ayudarme con sus consejos cuando más lo necesité.

A mi amiga Rocío Mora Nava, por estar junto a mí en todos los momentos buenos y malos, por brindarme su amistad incondicional durante tanto tiempo, por su valiosa ayuda y por dibujar una sonrisa cada día que pasamos juntas.

El mejor placer de la vida, es hacer lo que la gente te dice que no puedes hacer.

Walter B. Gehot

Hasta el día Dios se digne a descifrar el porvenir del hombre, todo el saber humano estará contenido en estas dos palabras: Confiar y Esperar.

Alejandro Dumas

Si alguna vez sucede que te rebasas a ti mismo por querer complacer a otra persona, ciertamente has perdido tu plan de vida.

Epicteto

Lo que no me mata me hace más fuerte.

Friedrich Nietzsche



## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1.1 Historia de la enfermedad</b>	1
<b>1.2 Taxonomía</b>	2
<b>1.3 Morfología</b>	4
<b>1.4 Metabolismo y condiciones de cultivo</b>	5
<b>1.5 Sistemas de secreción bacterianos</b>	6
1.5.1 Sistema de Secreción Tipo 1 (T1S)	7
1.5.2 Sistema de Secreción Tipo 3 (T3S)	8
1.5.3 Sistema de Secreción Tipo 4 (T4S)	8
1.5.4 Sistema de Secreción Tipo 5 (T5S)	8
1.5.5 Sistema de Secreción Tipo 6 (T6S)	9
1.5.6 Sistema de Secreción Tipo 2 (T2S)	9
1.5.6.1 Transporte a través de la membrana citoplasmática	9
1.5.6.2 Secreción a través de la membrana externa	12
<b>1.6 Epidemiología</b>	15
<b>1.7 Patogenia</b>	17
<b>1.8 Diagnóstico diferencial</b>	19
<b>1.9 Importancia en salud pública</b>	19
<b>1.10 Diagnóstico de laboratorio</b>	20
1.10.1 Técnicas indirectas	20
1.10.2 Aglutinación microscópica	20
1.10.3 Fijación de complemento	21
1.10.4 ELISA	21
1.10.5 Técnicas directas	21
1.10.6 Observación en microscopio de campo oscuro	22
1.10.7 Tinción argéntica	22
1.10.8 Aislamiento	22
1.10.9 Inmunohistoquímica	22
1.10.10 Inmunofluorescencia	23
1.10.11 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	23
<b>1.11 Tratamiento</b>	23
<b>1.12 Inmunidad</b>	23
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	25
<b>3. HIPÓTESIS</b>	26
<b>4. OBJETIVOS</b>	26
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	27
<b>5.1 Cultivo</b>	27
<b>5.2 Extracción de ADN genómico</b>	27
<b>5.3 Concentración de ADN</b>	29
<b>5.4 Síntesis de iniciadores</b>	29
<b>5.5 Reacción en cadena de la polimerasa</b>	29
<b>5.6 Precipitación de ADN</b>	30

<b>5.7 Secuenciación</b>	31
<b>5.8 Análisis <i>in silico</i></b>	31
<b>6. RESULTADOS</b>	32
<b>6.1 Cultivo</b>	32
<b>6.2 Concentración de ADN genómico</b>	32
<b>6.3 PCR</b>	33
<b>6.4 Análisis <i>in silico</i></b>	34
<b>7. DISCUSIÓN</b>	43
<b>8. CONCLUSIONES</b>	47
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	48

## LISTA DE CUADROS

	Página
<b>Cuadro 1.</b> Ejemplos de serovariedades y serogrupos	3
<b>Cuadro 2.</b> Clasificación genómica	4
<b>Cuadro 3.</b> Ejemplos de serovariedades y huésped de mantenimiento	16
<b>Cuadro 4.</b> Descripción de los principales signos y lesiones en animales domésticos	18
<b>Cuadro 5.</b> Diagnóstico diferencial en animales domésticos	19
<b>Cuadro 6.</b> Identidades realizadas entre las cepas Hond Utrecht IV, LOCaS 46 y un microorganismo Gram negativo con el programa blast-n	38
<b>Cuadro 7.</b> Porcentajes de identidad de pares de bases de la cepa Hond Utrecht IV con serovariedades de <i>Leptospira</i>	39
<b>Cuadro 8.</b> Porcentajes de identidad de pares de bases de la cepa LOCaS46 con serovariedades de <i>Leptospira</i>	40
<b>Cuadro 9.</b> Porcentajes de identidad de aminoácidos de la cepa Hond Utrecht IV con serovariedades de <i>Leptospira</i>	41
<b>Cuadro 10.</b> Porcentajes de identidad de aminoácidos de la cepa LOCaS 46 con serovariedades de <i>Leptospira</i>	42

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Morfología de <i>Leptospira</i>	4
<b>Figura 2.</b> Estructura de la superficie de <i>Leptospira</i>	5
<b>Figura 3.</b> Translocación de proteínas a través de la membrana interna dado por el sistema Sec	12
<b>Figura 4.</b> Transporte de proteínas a través de La membrana externa	14
<b>Figura 5.</b> Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, ADN genómico de la cepa Hond Utrecht IV	28
<b>Figura 6.</b> Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, ADN genómico de la cepa LOCaS 46	28
<b>Figura 7.</b> Observación de ADN cepas Hond Utrecht IV y LOCaS 46	32
<b>Figura 8.</b> Productos de PCR	33

## RESUMEN

Ordóñez López Liliana. Comparación de la organización genética de los loci *gsp* en 2 cepas de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola. (Tutor Dr Alejandro de la Peña Moctezuma; Comité Tutorial: Dr Edmundo Calva Mercado, Dr Alfredo Sahagún Ruiz).

La leptospirosis es una enfermedad que afecta principalmente perros, bovinos y cerdos; en forma accidental puede afectar al humano. En caninos, se caracteriza por una gran diversidad de manifestaciones clínicas, desde subclínica hasta la que incluye los síndromes hemorrágico, icterico, reproductivo y respiratorio. Está distribuida alrededor del mundo y es producida por serovariedades (SVs) de *Leptospira* patógenas. Mamíferos domésticos, fauna silvestre y roedores participan en el mantenimiento de la enfermedad y eliminándolas por la orina al medio. El agua y humedad favorecen su permanencia en el ambiente. La prevención se realiza mediante bacterinas y la respuesta inmune es serovariedad específica y dirigida contra el lipopolisacárido (LPS). La protección depende del uso de bacterinas contra las SVs predominantes en la región, lo que se refleja en resultados variables en la eficiencia de dichas bacterinas. Investigaciones recientes se han enfocado al estudio de proteínas de membrana externa comunes en las SVs patógenas, para su posible uso como herramienta tanto de diagnóstico, como de prevención. El Sistema de Secreción Tipo 2 es el principal sistema de secreción en bacterias Gram negativas, incluye proteínas transmembranales, periplasmáticas y de membrana externa asociadas con la secreción de diversas proteínas, incluyendo algunos factores de virulencia. Se han identificado 14-17 genes en los loci *gsp* en *Leptospira*, sin embargo, no existen estudios sobre su organización genética en la serovariedad Canicola. En este trabajo, se obtuvieron las secuencias de los loci *gsp* de dos cepas de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola, la cepa de referencia Hond Utrecht IV y un aislado virulento de canino denominado cepa LOCaS46. Las secuencias mostraron una identidad del 99% entre sí y con las SVs Copenhageni y Lai; del 89% con la SV Hardjobovis y 75% con la serovariedad Patoc respectivamente.

Palabras clave: *Leptospira*, Sistema de Secreción Tipo 2, serovariedades, secuencia.

## Abstract

Leptospirosis is a zoonotic bacterial infectious disease; most frequently infected domestic mammals are cattle, swine and dogs. Prevalence due to the different pathogenic *Leptospira* serovars (SVs) has a worldwide distribution. Different domestic and wild mammals particularly rodents' are the reservoirs for different SVs. The natural habitats of pathogenic SVs are the renal tubules of its reservoir, from where they are shed to the environment. Environmental humidity and water source enhance the leptospire survival in it. Several features of the disease and its epidemiological implications in domestic or wild animals are inadequately understood because of difficulties in diagnosis, the complexities of the host-leptospire relationship and the varying patterns of infection. In dogs a wide variety of clinical manifestations had been reported from asymptomatic shedder to hemorrhagic syndrome, jaundice, renal and hepatic failures. Most *Leptospira* bacterins had been centered on opsonizing antibodies directed to outer membrane structures, particularly to lipopolysaccharide (LPS). Immunological protection from leptospirosis is SVs specific and bacterins should contain those SVs enzootic to the country or animal species in which they are to be used. In contrast to LPS, leptospiral outer membrane proteins (OMPs) are highly conserved among leptospiral serovars. Efforts have been made to identify antigens to develop a recombinant vaccine against diverse serovars as well as diagnostic tools. Recent research had been focus in the Type II protein secretion system (T2S) in particular researchers are focusing in the General Secretion Pathway (GSP) that permit the export of proteins (including virulence factors) from within the bacterial cell to the extracellular milieu and/or into target host cells. The present research reports on *gsp* genetic loci organization of *L. Canicola*. Several authors had reported loci of 14 to 17 genes for some SVs. Genetic material (DNA), PCR amplications and sequence for the *gsp* loci sequences from a reference strain (*L. Interrogans* SV Canicola Hond Utrecht IV) and a wild strain, Mexican isolate (*L. interrogans* SV Canicola LOCaS46) were obtained. With those sequence results an *in silico* genomic identity analysis was done; where both Canicola strains showed a 99% identity between them and with SVs Copenhageni and Lai and a 89% and 75% with SV and Patoc respectively.

Keywords: *Leptospira*, Type II protein secretion system, serovars, sequence.

## 1. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es considerada como la zoonosis de mayor distribución a nivel mundial, causada por espiroquetas patógenas del género *Leptospira*, las cuales son morfológica y fisiológicamente uniformes pero serológica y epidemiológicamente presentan gran diversidad (Hirsh *et al.*, 2004). Entre los animales que comúnmente presentan la infección se encuentran los perros, bovinos, cerdos y caballos encontrándose signos clínicos muy variados incluyendo síndromes reproductivos, ictericos, urémicos y respiratorios (Adler and De la Peña-Moctezuma, 2009; Ko *et al.*, 2009).

### 1.1 Historia de la enfermedad.

En 1886 Adolf Weil, médico alemán fue el primero en describir una enfermedad infecciosa en humanos acompañada de esplenomegalia, nefritis e ictericia. Años después el agente etiológico fue identificado por Inada e Ido, los cuales lo reportaron como una espiroqueta y desde entonces varias leptospirosas han sido identificadas como el agente causal de distintos síndromes en humanos, así como en animales domésticos y silvestres (Faine *et al.*, 1999; Erosa-Barbachano, 2001). En el periodo comprendido de 1920-1960, se identificaron asociaciones medioambientales y ocupacionales para la presentación de la enfermedad, así que fue considerada como una enfermedad ocupacional (Faine *et al.*, 1999; León-Lara, 2005). Cuando Inada e Ido lograron aislar a *Leptospira* describieron la infección, la distribución del microorganismo en los tejidos y características morfológicas, mientras que las primeras observaciones años antes fueron realizadas por Stimson quien en secciones de riñón teñidas con plata provenientes de un paciente que sufría una forma de fiebre amarilla reportó la presencia de organismos en forma de espiral (Faine *et al.*, 1999; León-Lara, 2005). Posteriormente, se describió el papel de las ratas como portadoras del microorganismo, esto sirvió para comprender los principios epidemiológicos de la transmisión por reservorios, así como su control y la búsqueda de otros portadores de *Leptospira*. Así, muchas de las cepas fueron encontradas compartiéndose

entre portadores y algunas veces en portadores preferenciales (Bolin and Prescott, 1999).

Alrededor de la década de los 30 la leptospirosis fue identificada como una enfermedad primaria en los perros, al mismo tiempo fue considerada como un problema en la medicina veterinaria debido a las pérdidas en la producción de alimentos de origen animal ya que la leptospirosis causa falla reproductiva en el ganado, como abortos y una disminución considerable en la fertilidad, así como síndrome hipoagaláctico (agalactia); de igual forma se consideró como una potencial fuente de infección para humanos. El factor principal para que se dé la infección es siempre la exposición directa a tejidos de animales u orina contaminados con leptospiras o bien agua o lodos contaminados (Faine *et al.*, 1999; Radostits *et al.*, 1999).

En humanos Uhlenhut y Fromme describieron un caso de leptospirosis anictérica con signos clínicos menos severos. Comenzaba a ser claro que habían distintas formas de leptospirosis, esto dependía de la serovariedad involucrada, así, se observó que las SVs más comúnmente asociadas con la presentación severa de la enfermedad, también se encontraban en pacientes infectados ya fueran asintomáticos o con presentación leve. (Bolin and Prescott, 1999; Faine *et al.*, 1999).

## **1.2 Taxonomía.**

Las leptospiras pertenecen al orden Spirochaetales, familia Leptospiraceae y género *Leptospira* (Quinn *et al.*, 2002).

Son microorganismos con pared semejante a la de las bacterias Gram negativas pero se tiñen pobremente con esta tinción, por lo que no es la técnica de elección para ser observada; la técnica de elección es la microscopía en campo oscuro,

aunque también se pueden visualizar en tejidos por medio de inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y tinciones con plata (Hirsh *et al.*, 2004).

El sistema tradicional de clasificación se fundamenta en la especificidad serológica basada en la estructura y composición del lipopolisacárido (LPS), el cual es considerado como el antígeno estructural predominante en la membrana externa. Así, esta clasificación divide al género en 23 serogrupos y más de 260 serovariedades (Brooks *et al.*, 2004) (Cuadro 1). Así, se define a un serogrupo como un grupo de serovariedades que comparten similitud de antígenos, mientras que la serovariedad se asigna por medio de pruebas de aglutinación con sueros hiperinmunes de conejo. (Faine *et al.*, 1999)

Serogrupo	Serovariedad
Andamana	Andamana
*Australis	Australis
*Autumnalis	Autumnalis
*Ballum	Ballum
*Bataviae	Bataviae
*Canicola	Canicola
*Celledoni	Celledoni
Codice	Codice
*Cynopteri	Cynopteri
*Djasiman	Djasiman
*Grippotyphosa	Grippotyphosa
*Hebdomadis	Hebdomadis
Holland	Holland
*Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae
*Javanica	Javanica
*Louisiana	Louisiana
Lyme	Lyme
*Manhao	Manhao 4
*Mini	Mini
*Panama	Panama
*Pomona	Pomona
*Pyrogenes	Pyrogenes
*Ranarum	Ranarum
*Sarmin	Sarmin
*Sejroe	Hardjo
Semarang	Patoc
*Shermani	Shermani
*Tarassovi	Tarassovi

Cuadro 1. Ejemplos de serovariedades y serogrupos. (Basado en [www.pasteur.fr/recherche/Leptospira/Type Straains.html](http://www.pasteur.fr/recherche/Leptospira/Type_Straains.html))

\* Patógenas

Un segundo sistema de clasificación se basa en estudios de hibridación de ADN, los cuales han demostrado un alto grado de heterogenicidad entre las serovariedades patógenas y apatógenas (Brooks *et al.*, 2004); este método permite analizar diferencias entre cepas de la misma serovariedad que pueden correlacionarse con diferencias en la epidemiología de las cepas. Este sistema de clasificación divide a género *Leptospira* en 16 especies (Institut Pasteur UBM, 2006; Levett *et al.*, 2001; Radosits *et al.*, 1999) (Cuadro 2).

Patógena	No patógena	Indeterminada
<i>Leptospira alexanderi</i>	<i>Leptospira biflexa</i>	<i>Leptospira alistonii</i>
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	<i>Leptospira meyeri</i>	<i>Leptospira vanthielii</i>
<i>Leptospira interrogans</i>	<i>Leptospira wolbachii</i>	<i>Leptospira terpstrae</i>
<i>Leptospira kirschneri</i>		
<i>Leptospira noguchi</i>		
<i>Leptospira santarosai</i>		
<i>Leptospira weillii</i>		
<i>Leptospira fainei</i>		
<i>Leptospira inadai</i>		
<i>Leptospira wolfii</i>		

Cuadro 2. Clasificación genómica (adaptado de [www.pasteur.fr/recherche/Leptospira/Type\\_Strains.html](http://www.pasteur.fr/recherche/Leptospira/Type_Strains.html))

### 1.3 Morfología

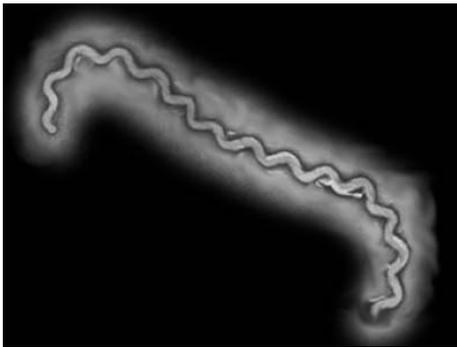


Figura 1. Morfología de *Leptospira*.  
[http://sameens.dia.uned.es/trabajos4/T1A/T1\\_LazaroArmengoIM/Agente.htm](http://sameens.dia.uned.es/trabajos4/T1A/T1_LazaroArmengoIM/Agente.htm)

Son espiroquetas, delgadas y flexibles, de 5 a 15  $\mu\text{m}$  de longitud y 0.1 a 0.2 de diámetro (Carter y Chengappa, 1994; Brooks *et al.*, 2004). Con frecuencia, uno o ambos extremos del microorganismo forman un gancho (Adler and De la Peña-Moctezuma, 2009) (Figura 1). Presentan una alta movilidad dada por 2 endoflagelos insertos en ambos extremos del microorganismo

(Bromley and Charon, 1979). Los movimientos que realizan son de rotación, flexión y translación, los cuales se pueden observar por medio de microscopía en campo oscuro o microscopía electrónica (Brooks *et al.*, 2004).

Las leptospiras son microorganismos adaptados a vivir en ambientes húmedos (Carter y Chengappa, 1994; Brooks *et al.*, 2004). La estructura detallada de este microorganismo es típica de una bacteria Gram negativa, la cual consta de membrana interna, membrana externa y la pared celular constituida de peptidoglicano (Adler and De la Peña-Moctezuma, 2009) (Figura 2).

El cilindro protoplásmico central contiene el citoplasma y el genoma conformado por dos cromosomas, encontrándose limitado por la membrana plasmática y por la pared celular constituida de péptidoglicano (Faine *et al.*, 1999).

La membrana externa de las leptospiras está formada por proteínas, lipoproteínas y lipopolisacárido (LPS); algunas de estas lipoproteínas son expuestas en la superficie celular y pueden estar involucradas en la patogénesis e inmunidad (Haake *et al.*, 2000; Cullen *et al.*, 2002).

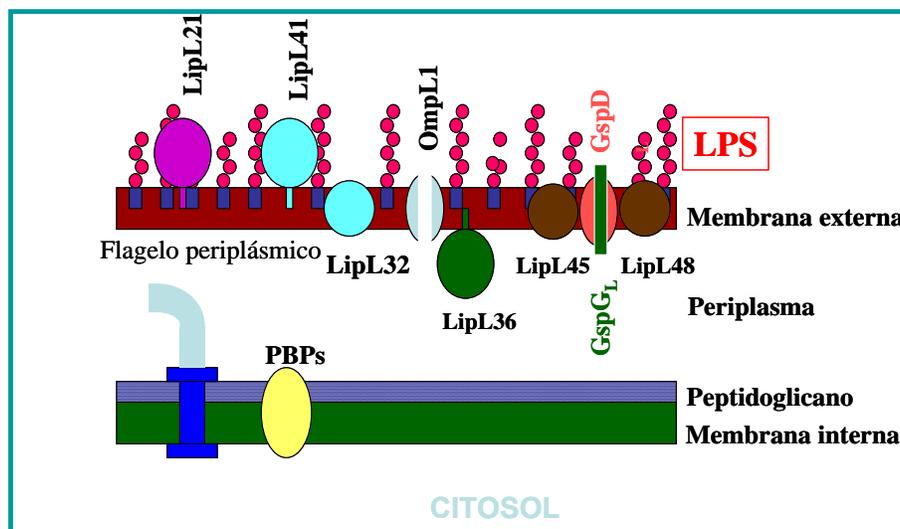


Figura 2. Estructura de la superficie de *Leptospira* [www.conacyt.mx/.../Membranaexterna.htm](http://www.conacyt.mx/.../Membranaexterna.htm)

### 1.3 Metabolismo y condiciones de cultivo.

Las leptospiras patógenas son microorganismos que se desarrollan *in vitro* en un ambiente aerobio o microaerofílico y a una temperatura óptima de 30 C (Adler and De la Peña-Moctezuma, 2009). Las cepas no patógenas se desarrollan desde los 11 C a los 13 C en un ambiente húmedo, aerobio o microaerofílico (Faine *et al.*, 1999; Quinn *et al.*, 2002). La fuente principal de energía y carbono tanto para las cepas patógenas como no patógenas, son los ácidos grasos de cadena larga 12-18 carbonos, de los cuales la energía es derivada de la  $\beta$ -oxidación, por el contrario, los azúcares no son fermentados y no pueden ser usados como fuente de carbono; los ácidos grasos requeridos para la nutrición y energía en el metabolismo de las leptospiras también son tóxicos, así que para el desarrollo en condiciones artificiales deben ser adicionados detoxificantes que los absorben y liberan lentamente a bajas concentraciones, por ejemplo: albúmina sérica bovina (Adler and De la Peña-Moctezuma, 2009).

Las leptospiras patógenas y no patógenas se desarrollan mejor en condiciones aeróbicas, en medios semisólidos abundantes en proteínas como el medio Fletcher o Stuart. Después de 1 a 2 semanas, se produce una zona difusa de desarrollo cercana al extremo superior del tubo para después formar un anillo al nivel de la tensión de oxígeno óptima para estos microorganismos, esta zona es conocida como anillo de Dinger (Faine *et al.*, 1999; Adler and De la Peña-Moctezuma, 2009).

El medio líquido por elección es el EMJH (Ellinghausen and McCullough; Johnson and Harris) en el cual se provee el medio ambiente adecuado para el desarrollo de las leptospiras, ácidos grasos de cadena larga son adicionados en forma de un complejo de sorbitol (Tween); el glicerol acelera el desarrollo, mientras que el piruvato ayuda a la replicación de algunas cepas cuando el inoculo es muy pequeño. Los iones de amonio son provistos como sales de amonio o por desaminación de aminoácidos y son la única fuente reconocida de nitrógeno. Así

mismo, la adición de cianocobalamina (vitamina B<sub>12</sub>) y tiamina (vitamina B<sub>1</sub>), son requeridas para el desarrollo de este microorganismo. Calcio, magnesio, hierro, de igual forma son esenciales. (Johnson and Wilson, 1980; Stalheim and Wilson, 1964; Adler and De la Peña-Moctezuma, 2009).

### 1.5 Sistemas de secreción bacterianos.

Las bacterias secretan un gran número de proteínas al medio extracelular entre las que se incluyen toxinas, adhesinas y diversas enzimas hidrolíticas que se requieren en diferentes aspectos del ciclo de vida bacteriano, como por ejemplo, en la biogénesis de organelos, la adquisición de nutrientes y la expresión de factores de virulencia (Thanassi and Hultgren, 2000).

La mayor parte de los estudios del sistema de secreción se han desarrollado en las bacterias Gram-negativas, en las que las proteínas a translocarse tienen que atravesar dos barreras lipídicas separadas por el espacio periplásmico y la capa de peptidoglicano: la membrana citosólica o membrana interna (MI), y la membrana externa (ME) que es una bicapa asimétrica cuya cara exterior está compuesta principalmente por lipopolisacárido (LPS) (Sandkvist, 2001; González-Pedrajo y Dreyfus, 2003) (Figura 2). En el caso de las bacterias Gram positivas la secreción de proteínas hacia el exterior celular requiere del transporte a través de una sola membrana (Thanassi and Hultgren, 2000).

Las vías de secreción en las bacterias Gram-negativas han sido clasificadas en cinco grupos principales: secreción tipo 1, 2, 3, 4, 5 (autotransportadores) y 6; dicha clasificación se basa en la naturaleza molecular de las maquinarias de transporte y las reacciones que éstas catalizan (Stathopoulos *et al.*, 2000; Sandkvist, 2001; Bingle *et al.*, 2008). Sin embargo, estos grupos se pueden subdividir en dos grandes clases dependiendo del mecanismo que se utiliza para el transporte a través de la membrana plasmática: las vías **Sec-dependientes**, utilizan el sistema de secreción denominado Sec, en el que las proteínas a secretarse presentan una secuencia señal en el extremo amino terminal y las **Sec-independientes** en las

que los sustratos se pueden translocar directamente desde el citosol hasta el exterior celular sin que exista un intermediario periplásmico, ni una secuencia señal en el amino terminal (González-Pedrajo y Dreyfus, 2003).

#### **1.5.1 Sistema de Secreción Tipo 1 (T1S).**

Este mecanismo es utilizado para la secreción de toxinas, proteasas y lipasas, es una vía Sec-independiente, por lo que no se requiere del procesamiento de un péptido líder para atravesar la membrana citoplasmática; la secreción proteica se da en un solo paso desde el periplasma hasta el exterior celular (Thanassi and Hultgren, 2000). Los sustratos a exportarse por este sistema presentan una señal de secreción en el extremo carboxilo terminal, la cual es específica para ciertas subfamilias de sustratos como por ejemplo, las proteasas; sin embargo, aún se desconoce la naturaleza de dicha señal y el mecanismo mediante el cual es reconocida (Thanassi and Hultgren, 2000; Lee and Schneewind 2001). El T1S está constituido por tres componentes: Un Canal en la membrana externa denominado PME (proteína de membrana externa), un transportador ABC (de sus siglas en inglés ATP binding cassette) en la membrana interna y una proteína anclada a la membrana interna denominada PF (proteína de fusión) (Buchanan, 2001; Lee and Schneewind 2001). Este mecanismo es utilizado para la secreción de la toxina  $\alpha$ -hemolisina en *E.coli*.

#### **1.5.2 Sistema de Secreción Tipo 3 (T3S).**

Es una vía Sec-independiente siendo identificado en una gran variedad de bacterias patógenas para los humanos, animales y plantas, incluyendo especies de *Bordetella*, *Chlamydia*, *Erwinia*, *E.coli*, *Pseudomonas*, *Rhizobia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Xanthomonas* y *Yersinia*. Mediante este sistema los factores de virulencia se pueden translocar hasta el citosol de la célula eucarionte (Galán and Collmer, 1999). Además de su papel en la patogénesis, el T3S se requiere para la biogénesis flagelar, y es también esencial para el establecimiento de la relación

simbiótica entre *Rhizobium* y plantas leguminosas (Viprey *et al.*, 1998; Macnab, 1999).

### **1.5.3 Sistema de Secreción Tipo 4 (T4S).**

Este sistema secreta tanto ácidos nucleicos como proteínas. La exportación de la toxina pertussis por *Bordetella pertussis* se lleva a cabo a través de esta vía y se han identificado sistemas homólogos en diferentes bacterias como *Legionella pneumophila*, *Helicobacter pylori* y *Brucella suis*. Esta vía no requiere de intermediarios periplasmáticos, por lo que la secreción es Sec-independiente (Christie and Vogel, 2000).

### **1.5.4 Sistema de Secreción Tipo 5 (T5S).**

Es una vía Sec-dependiente; sin embargo, las proteínas no requieren de factores adicionales para transitar del espacio periplásmico hacia el exterior celular. A través de este sistema se exportan proteínas, incluyendo proteasas, toxinas, adhesinas e invasinas. El extremo carboxilo terminal de la proteína dirige la secreción de la región amino terminal a través de la membrana externa (Koster *et al.*, 2000; Thanassi and Hultgren, 2000). La proteína a secretarse presenta tres diferentes regiones funcionales: una secuencia señal en el amino terminal para atravesar la membrana interna, seguida de un dominio  $\beta$  también llamado pasajero, que dará origen a la proteína expuesta a la superficie celular y el dominio  $\beta$  en el carboxilo terminal, que permite la secreción a través de la membrana externa formando una estructura de barril- $\beta$  con 10-18 hebras antiparalelas (Henderson *et al.*, 1998).

### **1.5.5 Sistema de Secreción Tipo 6 (T6S).**

El T6S es el mecanismo de secreción proteínas más recientemente descrito en bacterias Gram negativas, siendo identificado como un importante sistema de translocación de factores de virulencia en algunas bacterias patógenas como *Vibrio cholerae*, así como en la translocación de proteínas en células eucariontes (Bingle *et al.*, 2008).

### 1.5.6 Sistema de Secreción Tipo 2 (T2S).

En el Grupo de Investigación en *Leptospira* y Leptospirosis de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) se tienen indicios de que GspD, la secretina del T2S, es una proteína que se encuentra anclada en la membrana externa en bacterias Gram negativas, es expresada *in vitro* así como en tejidos de hámsteres infectados con leptospiras patógenas. (Alcaraz Sosa, 2008; Rodríguez Reyes, 2008). Así mismo se han obtenido secuencias parciales de genes del T2S en algunas serovariedades como *Icterohaemorrhagiae* (Flores Popoca, 2006) y la serovariedad apatógena Patoc (Mena Bañuelos, 2006), de esta manera se asume que los componentes del T2S se encuentran presentes en *Leptospira*.

El T2S es una vía Sec-dependiente; la secreción extracelular de proteínas, entre las cuales se incluyen proteasas, fosfolipasas, lipasas y toxinas que juegan en algunos casos un papel importante como el principal mecanismo de virulencia en la infección bacteriana causada por bacterias Gram negativas (Thanassi, 2000; Sandkvist, 2001).

Esta vía también se conoce como sistema general de secreción del inglés General Secretion Pathway (Gsp) y ocurre en dos etapas (Desvaux *et al.*, 2004). Primero, la maquinaria Sec transloca el sustrato con péptido líder a través de la membrana plasmática. Dicho péptido líder es generalmente una secuencia corta (de aproximadamente 30 aminoácidos), de los que uno o varios presentan carga positiva, además de una secuencia de 10 a 20 aminoácidos hidrofóbicos (Stathopoulos *et al.*, 2000; González-Pedrajo y Dreyfus, 2003; Cianciotto *et al.*, 2005).

En una segunda etapa, la proteína pierde el péptido señal y adquiere su conformación nativa en el espacio periplásmico, para posteriormente ser secretada a través de la ME por un complejo sistema multiprotéico, el sistema de

secreción tipo 2 o secretón (González-Pedrajo y Dreyfus, 2003). A continuación se describen ambas etapas.

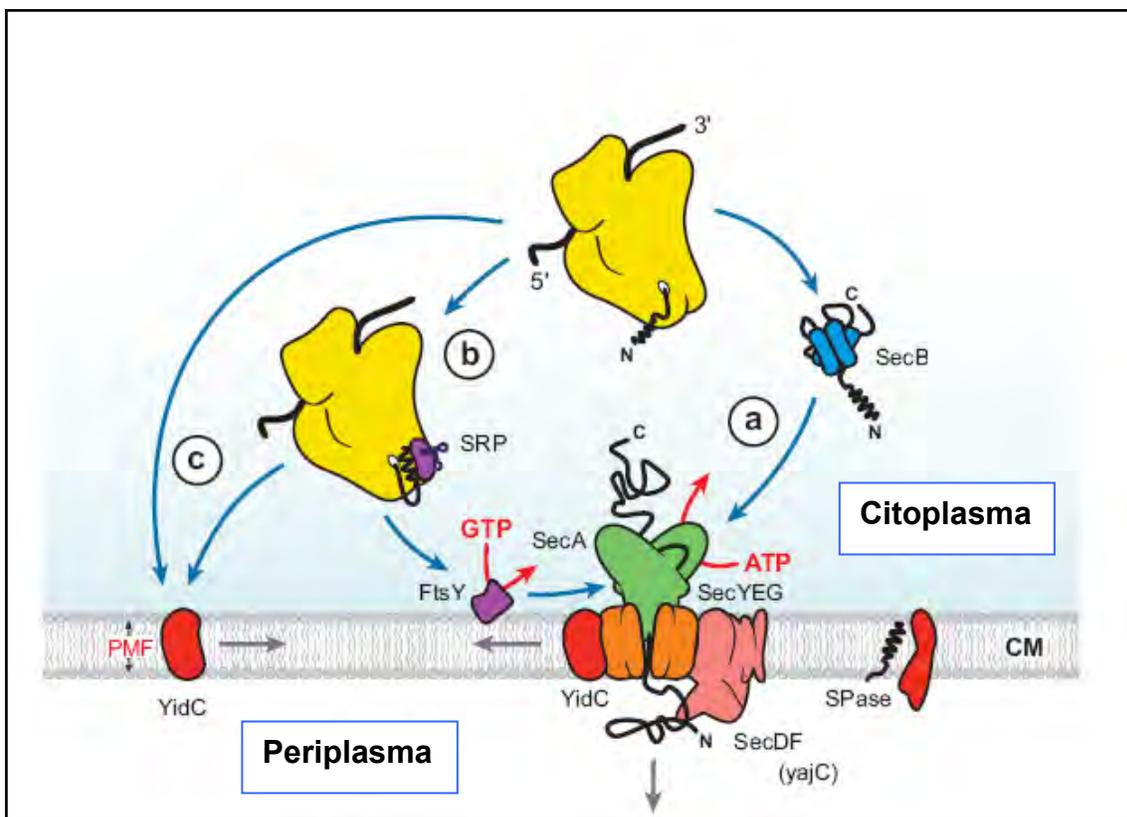
#### **1.5.5.1 Transporte a través de la membrana citoplasmática.**

En *E.coli* el poro de translocación de la vía Sec consta de una chaperona citoplasmática (SecB), una ATPasa periférica que interviene la translocación (SecA), y un complejo proteico formado por al menos 6 proteínas denominadas SecY, SecE, SecD, SecF, SecG y YajC, las cuales pueden aceptar sustratos de dos diferentes fuentes. Por un lado, la proteína precursora (con el péptido señal), se mantiene en un estado de secreción competente o desplegado gracias a la unión con la proteína chaperona SecB, quien la dirige a la subunidad periférica SecA del complejo de translocación heterotrimérico SecYEGDFYajC, en la membrana citoplásmica (Stathopoulos *et al.*, 2000). La proteína periférica SecA es una ATPasa cuya actividad de hidrólisis provee de la energía necesaria para la exportación. Por otro lado, un segundo mecanismo involucra una translocación co-traducciona (sin la participación de secB), en donde una proteína naciente con su péptido señal es reconocida por la “partícula de reconocimiento de la señal” (SRP) y su receptor. Las dos rutas eventualmente convergen en el poro de translocación SecYEGDFYajC que se encuentra asociado con la ATPasa periférica SecA (Stathopoulos *et al.*, 2000; González-Pedrajo y Dreyfus, 2003).

La selección de la ruta es determinada inmediatamente después de que la secuencia señal naciente sale del ribosoma. Una vez que los polipéptidos se translocan, una peptidasa procesa el péptido líder, para finalmente liberar a la proteína madura en el espacio periplásmico (González-Pedrajo y Dreyfus, 2003).

En la ruta regulada por la chaperona SecB, ésta reconoce al dominio naciente de la preproteína; el complejo binario se dirige a SecYEGDF unido a SecA, o bien, primero se asocia con SecA en el citosol a través de una interacción de baja afinidad, hasta que los sitios de translocación en la membrana estén disponibles. Para interactuar con la translocasa se requiere de la unión de alta afinidad entre

SecB y SecA, lo cual es seguido de la unión de la secuencia señal a SecA, lo que a su vez estabiliza la interacción SecA-SecB. Por último, se transfiere la preproteína de SecB a SecA, se libera SecB de la membrana y se inicia la translocación, proceso que se encuentra acoplado a la unión de ATP por SecA. La energía de la hidrólisis de ATP se utiliza para la transferencia de la preproteína de SecA hacia SecYEG (Figura 3). Una vez que esto sucede, la translocación hacia el periplasma puede ser dirigida por la fuerza protón motriz. (Driessen and Nowen, 2007).



**Figura 3. Esquema del translocación de proteínas a través de la membrana interna (MI) dado por el sistema Sec. A)** Ruta regulada por la chaperona Sec B; reconocimiento de la preproteína para después dirigirse al complejo Sec YEGDF y SecA, la cual libera la energía necesaria para translocar la proteína al periplasma. **B)** Ruta co-traduccional, la proteína naciente con su péptido señal es reconocida por la partícula de reconocimiento SRP. **C)** La proteína es llevada al complejo Sec YEGDF y SecA para ser traslocada en el periplasma (Driessen and Nowen, 2008).

### 1.5.5.2 Secreción a través de la membrana externa.

El T2S para la secreción de proteínas a través de la ME, entre las cuales se incluyen proteasas, lipasas y toxinas, está constituido por entre 12 y 16 proteínas accesorias, cuya nomenclatura incluye las siglas GSP (Sandkvist, 2001; Cianciotto, 2005). Los genes codificantes aparecen organizados en un operón (*gsp*). Después de su traslocación por el sistema Sec al periplasma, las proteínas sufren modificaciones, tales como la formación de puentes disulfuro o la oligomerización y adquieren su conformación nativa. El T2S incluye dos componentes en la ME: las proteínas GspD y GspS. La proteína GspD, que pertenece a la familia de las secretinas, se inserta en la ME y por medio de oligomerización formando un anillo dodecamérico con un diámetro interno de entre 76 y 95 Å, suficiente para transportar polipéptidos plegados (Stathopoulos *et al.*, 2000; Thanassi and Hultgren, 2000). Por su parte, la proteína GspS es una lipoproteína de la ME que actúa como chaperona de GspD para su correcto plegamiento y actividad (González-Pedrajo y Dreyfus, 2003). Sin embargo, la mayoría de las proteínas de este sistema (GspBCFHJKLMNO) se localizan en la MI o en el periplasma asociadas a la MI, mientras que la ATPasa GspE, que energiza el proceso, se localiza en la región citosólica e interactúa con la proteína GspL de la MI (Stathopoulos *et al.*, 2000). Los T2S presentan a la secretina GspD conservada entre diferentes bacterias Gram negativas y también presentan componentes homólogos del T3S y del proceso de polimerización del pili tipo IV, que es una estructura filamentosa de adhesión presente en algunas bacterias patógenas como por ejemplo, *E.coli*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*; y que también participa en la movilidad independiente de flagelo que se da sobre superficies sólidas. Cinco de los componentes del T2S (GspGHIJK) son similares a las subunidades estructurales del pili tipo IV, por lo que se han denominado pseudopilinas y se exportan con una secuencia señal de prepilina que es procesada por GspO (Cianciotto, 2005). Se ha propuesto que estas proteínas se ensamblan en una estructura tipo pili que atraviesa el periplasma y que pudieran ayudar de forma directa o indirecta en el proceso de secreción. En este sentido, se



dentro de las cuales se encuentra la porina OmpL1, (Haake *et al.*, 1993) y varias lipoproteínas: LipL41 (Shang *et al.*, 1996), LipL36 (Haake *et al.*, 1998), LipL32 (Haake *et al.*, 2002), LipL21 (Cullen *et al.*, 2003) LipL48 (Haake and Matsunaga, 2002), LigA (Palaniappan *et al.*, 2002), LigB (Matsunaga *et al.*, 2003). El centro de las investigaciones hacia la búsqueda de antígenos protectores se basa en el uso de proteínas de membrana externa, las cuales debido a que son conservadas entre las serovariedades patógenas se cree que pueden estimular una inmunidad heteróloga (Cullen *et al.*, 2003).

## **1.6 Epidemiología.**

La leptospirosis se presenta en todo el mundo, principalmente en regiones tropicales y donde sea que haya un riesgo de contacto directo o indirecto principalmente con orina o tejidos de animales infectados (Bharti *et al.*, 2003). Este microorganismo muere con la desecación, o en condiciones ácidas, así que la transmisión esta relacionada directamente con la presencia de humedad. La más frecuente fuente de infección es la orina o charcos y lodos contaminados con el microorganismo; cabe señalar que la enfermedad no se transmite por ingestión de alimentos o por inhalación de aerosoles. El principal riesgo de infección para contraer leptospirosis no ocupacional es el contacto con roedores, perros y animales de producción, en los poblados rurales o con pobre urbanización, específicamente en climas tropicales estando en contacto con animales domésticos infectados (Bolin *et al.*, 1999). La leptospirosis ocupacional se encuentra asociada con actividades tales como la práctica veterinaria, trabajadores del sector agropecuario, pescadores, trabajadores de rastros y frigoríficos, propietarios de perros e incluso atletas que practican natación en lagos y lagunas contaminados con el microorganismo (Bharti *et al.*, 2003).

Epidemiológicamente la leptospirosis, se clasifica en dos categorías:

1. Leptospirosis causada por serovariedades adaptadas al huésped.
2. Leptospirosis causada por serovariedades no adaptada al huésped.

Así, un animal infectado con una serovariedad adaptada al huésped se denomina huésped de mantenimiento o reservorio (Faine *et al.*, 1999; Grooms, 2006). La exposición de los animales susceptibles a las serovariedades no adaptadas al huésped producen una enfermedad accidental (Radostits *et al.*, 1999). Algunas serovariedades están adaptadas a un reservorio en particular, aunque pueden causar enfermedad en cualquier especie de mamíferos; de esta forma, una serovariedad se comporta de manera diferente dentro de su especie de mantenimientos que dentro de un huésped accidental (Quinn *et al.*, 2002).

Un huésped de mantenimiento tiene las siguientes características:

Presentar una alta susceptibilidad a la infección.

Transmisión endémica.

Patogenicidad relativamente baja para su huésped.

Tendencia a sufrir una enfermedad crónica.

Persistencia de la serovariedad en riñones y aparato genital.

Respuesta baja de anticuerpos frente a la infección, dificultando el diagnóstico.

Baja eficacia de la vacunación para prevenir la infección.

Por el contrario, un huésped incidental presenta las siguientes características.

Frecuencia relativamente baja a la infección, pero con una patogenicidad alta para el huésped.

Tendencia de sufrir la enfermedad aguda.

Transmisión esporádica en la especie del huésped y adquisición de la infección de otra especie, a menudo en forma epidémica.

Presentar una fase renal corta.

Respuesta de anticuerpos intensa frente a la infección.

La utilización de vacunas es más eficaz para prevenir la infección. (Faine *et al.*, 1999; Radostits *et al.*, 1999) (Cuadro 3).

SEROVARIEDAD	HUÉSPED MANTENIMIENTO	HUÉSPED ACCIDENTAL
Bratislava	Equinos/Cerdos	Equinos, caninos
Canicola	Caninos	Cerdos, bovinos, humanos
Grippotyphosa	Mapache	Bovinos, cerdos, equinos, caninos
Hardjo	Ganado (bovinos)	Humanos
Icterohaemorrhagiae	Rata café	Animales domésticos, humanos
Pomona	Cerdos, bovinos	Equinos, perros, humanos
Ballum	Roedores (ratones)	Caninos, humanos

Cuadro 3. Ejemplos de serovariedades y su huésped de mantenimiento (Quinn *et al.*, 2002)

### 1.7 Patogenia.

Las leptospiras invaden el huésped a través de las superficies mucosas o la piel reblandecida o con abrasiones (Radostits *et al.*, 1999). El microorganismo tiene la capacidad de unirse a las células epiteliales y adherirse a los constituyentes de la matriz extracelular a través de un proceso activo que se sugiere involucra proteínas de superficie (Brooks *et al.*, 2004). Las leptospiras, tanto patógenas como apatógenas tienen la capacidad de desarrollar biopelículas, lo cual puede estar involucrado en la habilidad que tienen para sobrevivir en diversos ambientes incluyendo el huésped (Ristow *et al.*, 2008).

Las leptospiras invaden inmediatamente el torrente sanguíneo en donde se multiplican rápidamente, dando origen a una fase leptospirémica, que dura de 7 a 10 días desde el inicio de la enfermedad y durante la cual es posible aislarlas de la sangre (Bolin, 1999). Los microorganismos se establecen en órganos parenquimatosos, principalmente en hígado y en túbulo renales, a consecuencia de esto último se produce una fase de leptospiruria. Otros tejidos infectados pueden ser los músculos, ojos y meninges, en las que se pueden originar una meningitis no supurativa (Biberstein, 1990). Una vez establecida en órganos se produce una vasculitis como lesión principal, seguida de hemorragias y necrosis

(Mandell *et al.*, 1991, Monahan *et al.*, 2009). La infección varía desde la presentación asintomática, a síndrome anictérico al icterico, con hemorragias generalizadas, anemia y hemoglobinuria, dando lugar a la disfunción orgánica de diversos grados, lo cual conduce a la aparición de ictericia, hemorragias producidas por liberación de hemolisinas y cuadros de insuficiencia renal (Bolin, 1999).

La lesión vascular ocurre también en los riñones y si la hemólisis es intensa se puede producir anoxia anémica y nefrosis hemoglobinúrica, la infección se localiza en el parénquima renal, causando una nefritis intersticial y la persistencia de las leptospiras en estas lesiones produce una mayor duración de la fase de leptospiruria; así, la lesión renal se desarrolla porque la infección persiste en este órgano mucho después de que se haya eliminado de los otros tejidos, estableciendo el estado de portador renal (Biberstein, 1990).

En esta fase aguda de la enfermedad, el animal puede morir por septicemia o anemia hemolítica, o ambas. Posteriormente, el animal puede morir de uremia causada por la nefritis intersticial (Brooks *et al.*, 2004). Ejemplos de manifestaciones clínicas por especie animal y serovariedad se presentan en el cuadro 4.

El grado y distribución de la afección en órganos varía en las diversas enfermedades producidas por diferentes SVs de leptospiras en varias partes del mundo y la relación de los diversos huéspedes con las mismas (huésped accidental), en donde las lesiones son leves o subclínicas (Grooms *et al.*, 2006). En los hospederos habituales la afección renal es crónica y elimina gran número de microorganismos en la orina, siendo la principal fuente de contaminación hacia el humano (Bolin, 1999). Después de los diez días se pueden detectar anticuerpos, principalmente IgM en la primoinfección (Radostits *et al.*, 1999).

Huésped	Serovariedad	Manifestaciones clínicas
Bovinos	Hardjobovis	Enfermedad subclínica con o sin leptospiuria
	Pomona, Canicola	Abortos
	Hardoprajitno	Infertilidad
	Pomona, Icterohaemorrhagiae, Canicola	Hemoglobinuria, ictericia, fiebre en becerros, ocasionalmente meningitis.
Porcinos	Pomona, Tarassovi, Bratislava	Enfermedad subclínica a menudo con leptospiuria
	Pomona	Fiebre, mastitis focal no supurativa
	Canicola, Icterohaemorrhagiae	Fiebre, anorexia, ictericia, hemoglobinuria y alta mortalidad en cerdos jóvenes.
Caninos	Canicola	Enfermedad subclínica a menudo con leptospiuria
	Icterohaemorrhagiae, Pomona	Enfermedad aguda hemorrágica, fiebre elevada, vómito, postración, muerte temprana, ictericia aguda, depresión, melena.
	Icterohaemorrhagiae, Pomona, Grippotyphosa	Uremia asociada con extenso daño hepático, estomatitis ulcerativa y uremia.
Equinos	Pomona	Oftalmia periódica, uveitis, abortos ocasionales. Raramente ictericia, fiebre o anorexia.
Ovinos	Pomona, Copenhageni	Ocasionalmente leptospiuria aguda con depresión, disnea, hemoglobulinuria, anemia y alta mortalidad en corderos.
	Hardjobovis	Infección subclínica con leptospiuria.

Cuadro 4. Descripción de los principales signos y lesiones en animales domésticos (Adaptado de Quinn, 2002)

### 1.8 Diagnóstico diferencial.

Un diagnóstico positivo de leptospirosis es a menudo difícil debido a la variación en la naturaleza de la enfermedad y a la gran gama de manifestaciones clínicas que se presentan, por lo tanto es de suma importancia conocer el diagnóstico diferencial en las diferentes especies domésticas (Radostits *et al.*, 1999) (Cuadro 5).

Bovinos	Babesiosis, anaplasmosis, hemoglobinuria bacilar y del puerperio, rinotraqueitis bovina infecciosa, toxoplasmosis, brucelosis, diarrea viral bovina, campilobacteriosis, intoxicación por trébol.
Porcinos	Brucelosis, parvovirus porcino, síndrome respiratorio reproductor porcino (PRRS), enfermedad de Aujeszky, peste porcina.
Ovinos y caprinos	Anaplasmosis, intoxicación crónica por cobre.
Equinos	Infecciones por <i>Streptococcus zooepidemicus</i> , herpes virus equino, artritis viral equina, anemia infecciosa equina, mioglobinuria paralítica, oftalmia periódica
Caninos	Parvovirus canina, insuficiencia renal aguda y crónica, hepatitis viral, otras hepatitis.

Cuadro 5 Diagnóstico diferencial en animales domésticos (Adaptado de Quinn *et al.*, 2002)

### 1.9 Importancia en salud pública.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la leptospirosis está catalogada como la zoonosis de mayor difusión mundial. El hombre es susceptible a todas las serovariedades y adquiere la enfermedad por medio de contacto directo con orina de animales excretores, animales domésticos y roedores infectados, así como en forma indirecta con agua, tierra y lodo contaminados (Bolin, 1999; Ko *et al.*, 2009). La infección en humanos se conoce principalmente como enfermedad de Weil y es considerado como huésped accidental; entre las serovariedades de *Leptospira* que afectan al hombre se encuentran Hardjo, Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona (Carter *et al.*, 1994). Así, la combinación huésped-serovariedad debe ser considerada cuando se refiere a la epidemiología, transmisión, signos clínicos, tratamiento y control de la leptospirosis en animales y humanos. (Bolin, 1999).

### 1.10 Diagnóstico de laboratorio.

El diagnóstico óptimo debe basarse en el aislamiento, cultivo y caracterización, pero las peculiares características de las leptospirosis “*in vitro*”, tales como

desarrollo lento y aislamiento difícil, hacen que la [metodología](#) diagnóstica de elección y considerada como prueba de referencia por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) sea la prueba indirecta de aglutinación microscópica (AM), la cual es una prueba serológica; con una alta variabilidad, así como complicaciones en la interpretación de resultados (Faine *et al.*, 1999).

### **1.10.1 Técnicas indirectas.**

Los métodos serológicos brindan un diagnóstico en corto tiempo y son capaces de detectar anticuerpos antileptospirales, principalmente IgM, además, son las pruebas de laboratorio más utilizadas en el diagnóstico de la leptospirosis, al igual que para la realización de estudios epidemiológicos (Bharti *et al.*, 2003). El mayor problema que presenta es los niveles de anticuerpos, aunque se mantengan durante años, alcanzan niveles tan bajos en animales y personas infectadas crónicamente que no siempre se detectan. Para el diagnóstico serológico se ha utilizado técnicas tales como: la aglutinación microscópica, aglutinación macroscópica, fijación de complemento, ELISA y PCR (Radostits *et al.*, 1999).

### **1.10.2 Aglutinación microscópica.**

Es el método serológico de referencia para el diagnóstico de leptospirosis, se emplea para detectar anticuerpos en sueros de animales sospechosos o enfermos, donde el suero del paciente reacciona con antígenos vivos de leptospiras patógenas (Faine *et al.*, 1982).

A pesar de ser la prueba más recomendada y extendida, presenta una serie de desventajas: no distingue anticuerpos vacunales de los de infección, resulta difícil su estandarización ya que su valoración es subjetiva; requiere el mantenimiento

de cultivos de leptospiras y no siempre detecta a los animales infectados (Radostits *et al.*, 1999; Faine *et al.*, 1999).

### **1.10.3 Fijación del complemento (FC).**

Es considerada igual de confiable que la aglutinación microscópica para la detección de animales con leptospiruria, pero detecta sólo infecciones recientes. Es una herramienta epidemiológica para dar un diagnóstico rápido. Las desventajas son las sustancias anticomplementarias del suero, la corta vida e inestabilidad del antígeno, no permite la diferenciación de serovariedades y no detecta niveles bajos de anticuerpos (Smith *et al.*, 1994).

### **1.10.4 ELISA.**

Este método es capaz de detectar anticuerpos durante la primera semana de la enfermedad, además, se considera como más sensible que la AM. A pesar de que es una prueba muy eficaz, aun no está considerada como prueba oficial, sin embargo es una prueba de detección a nivel de género y no de serovariedad (Faine *et al.*, 1999).

### **1.10.5 Técnicas directas.**

Se basa en la demostración de la presencia de leptospiras, o sus componentes en sangre, tejidos y leche de animales y humanos con signos clínicos.

### **1.10.6 Observación en microscopio de campo oscuro.**

Este método se realiza para la observación de leptospiras en los fluidos orgánicos en un microscopio óptico de campo oscuro a 400x aumentos, sin embargo, la interpretación es difícil debido al gran número de artefactos, que por su parecido con las leptospiras, pueden crear confusión (Bharti *et al.*, 2003).

### **1.10.7 Tinción argéntica.**

Dentro de este grupo podemos considerar diferentes técnicas, como: la técnica de Warthing-Starry y sus modificaciones y la técnica de Steiner y Steiner, donde los tejidos adquieren tonos de amarillos a café claro y las leptospiras se observan en sepia oscuro o negro con su forma característica de espiroqueta (Faine *et al.*, 1999).

### **1.10.8 Aislamiento.**

Las leptospiras pueden ser aisladas de sangre durante los primeros 7-10 días postinfección; así como de orina durante la segunda y tercera semana de la enfermedad o de tejidos como encéfalo, pulmón, hígado y riñón, siendo este último el órgano de elección en presentaciones crónicas o subclínicas (Barthi *et al.*, 2003). Es la técnica más sensible para el diagnóstico de leptospirosis, además es la que confirma la presencia del microorganismo, tanto en casos agudos como crónicos; el inconveniente que tiene, es la dificultad de desarrollo en condiciones artificiales y el tiempo que tarda en desarrollar es muy largo y presenta un bajo porcentaje de efectividad, entre el 11% y el 17% (Faine *et al.*, 1999; Barthi *et al.*, 2003).

### **1.10.9 Inmunohistoquímica.**

Se realiza a través de secciones de tejidos embebidos en bloques de parafina donde las leptospiras pueden visualizarse utilizando suero inmune de conejo anti-leptospira y detectando por un anticuerpo-antilgG de conejo secundario marcado con peróxido de hidrógeno (Faine *et al.*, 1999). Esta técnica también ha sido

utilizada para demostrar la expresión de antígenos específicos en tejidos de animales infectados experimentalmente (Alcaraz Sosa, 2008).

#### **1.10.10 Inmunofluorescencia.**

Es utilizada en la revisión de orina, otros fluidos corporales y tejidos frescos congelados; donde las leptospiras pueden visualizarse fluoresciendo con mayor facilidad, en comparación con la tinción de plata. El principio es semejante a la inmunoperoxidasa pero el suero secundario es marcado generalmente con isotiocianato de fluoresceína. Una desventaja de esta técnica es que se requiere la utilización de un microscopio de fluorescencia (Smith *et al.*, 1994; Faine *et al.*, 1999).

#### **1.10.11 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

La PCR es una técnica molecular usada para la detección de ADN de *Leptospira* en muestras clínicas como sangre, orina y muestras de tejido como hígado o riñón; es una técnica muy sensible y específica, la cual diferencia entre cepas patógenas y no patógenas utilizando los iniciadores G1 y G2. Una ventaja en la utilización de la PCR es que se puede realizar a partir de una muestra muy pequeña de tejido o fluido (Cameron *et al.*, 2008).

#### **1.11 Tratamiento.**

El objetivo del tratamiento en las infecciones causadas por leptospiras consiste en controlar la infección antes de que ocurran daños irreversibles, principalmente en hígado y riñones. Esto se logra mediante el uso de quimioterapéuticos como penicilinas, fluoroquinolonas, tetraciclinas y estreptomicina; para que el tratamiento sea satisfactorio debe ser administrado en etapas tempranas y en caso de sospecha de haber estado expuesto al microorganismo (Hirsh *et al.*, 2004).

## 1.12 Inmunidad.

La respuesta inmune que se genera en la infección causada por *Leptospira* es de tipo humoral, dada por el lipopolisacárido (LPS), el cual es el mayor antígeno de superficie en este microorganismo. Las variaciones en las cadenas de carbohidratos del LPS son las responsables de la diversidad antigénica observada entre las cepas de leptospirosis patógenas; así, la inmunidad está dada principalmente por dicho antígeno, el cual es específico de serovariedad. Las bacterinas actuales consisten en cepas muertas de leptospirosis, las cuales inducen la producción de anticuerpos contra los carbohidratos de esta cadena de LPS (Guerreiro *et al.*, 2001; Kiozumi y Watanabe, 2005).

En la actualidad, la búsqueda e identificación de proteínas conservadas de la membrana externa y que puedan generar una protección cruzada entre las diferentes serovariedades de *Leptospira* es el centro de atención de las investigaciones (Guerreiro *et al.*, 2001; Cullen *et al.*, 2003).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Las proteínas del sistema de secreción tipo 2 (T2S) están codificadas por aproximadamente 14 a 17 genes denominados con las siglas *gsp*; que aparecen organizados como un operón. Las proteínas que forman el T2S, son las encargadas del transporte de proteínas a través de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, dentro de las cuales se incluyen proteasas, lipasas, fosfolipasas y toxinas. (Sandkvist, 2001).

Evidencias genéticas demostraron la existencia de genes que codifican para proteínas del T2S en *Leptospira* (Flores Popoca, 2006; Mena Bañuelos, 2006; Rodríguez Reyes, 2008), pero su existencia y organización genética no ha sido evidenciada en la serovariedad Canicola. La comparación de los loci *gsp* de dos variantes de la serovariedad Canicola que incluyen: a) La cepa de referencia Hond Utrecht IV no virulenta y b) Un aislado virulento de perros, la cepa LOCaS 46, pudieran mostrar indicios sobre la conservación de este importante sistema de secreción en relación con la virulencia.

### **3. HIPÓTESIS**

La serovariedad Canicola cepas Hond Utrecht IV (referencia) y LOCaS 46 (GrLLep) podrían presentar una organización genética similar en sus genes *gsp* a las que presentan las serovariedades Lai y Copenhageni y sus genes estar conservados entre sí.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo general.**

Describir y comparar la organización genética de los loci *gsp* entre las cepas Hond Utrecht IV y LOCaS 46 de la serovariedad Canicola.

#### **4.2. Objetivos específicos.**

**4.2.1.** Secuenciación de los genes de los loci *gsp* de las cepas Hond Utrecht IV y LOCaS 46 de la serovariedad Canicola

**4.2.2.** Comparar y analizar *in silico* las secuencias de los genes *gsp* de dichas cepas con las de las serovariedades Lai, Copenhageni, Hardjobovis y Patoc.



## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Cultivo.

La serovariedad Canicola cepa de referencia Hond Utrecht IV y un aislado canino virulento para el hámster (DL50= $\leq$ 10) cepa LOCas 46 (Castillo Sánchez, 2008), fueron cultivadas por separado en 100 ml de medio EMJH (Apéndice 1), suplementado con 1% de albúmina sérica bovina fracción V e incubadas a 30 C por un lapso de 7 a 10 días hasta alcanzar un desarrollo de 0.5 de turbidez según el nefelómetro de McFarland, lo cual equivale aproximadamente a  $10^6$  leptospiras/ml de cultivo.

### 5.2. Extracción de ADN genómico.

Se realizó por medio del método de tiocianato de guanidina (Pitcher *et al*, 1991). Brevemente, el cultivo de leptospiras se concentró por medio de centrifugación a 10,000 xg por 10 min a 4 C. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se agregaron 275  $\mu$ l de solución de lisis (tiocianato de guanidina<sup>1</sup> 5M, EDTA 0.1 M, Sarcosil<sup>2</sup> 0.5%) a la pastilla bacteriana, se mezcló con la solución de lisis en el agitador tipo vortex durante 10 minutos. Se agregaron 125  $\mu$ l de solución al 7.4 M de acetato de amonio<sup>3</sup> y se mezcló invirtiendo el tubo de 5 a 10 veces; colocando en hielo durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se agregaron 250  $\mu$ l de cloroformo<sup>4</sup>-alcohol isoamílico<sup>5</sup> (24:1) y se mezcló nuevamente en el vortex durante 5 min. Una vez mezclado, el contenido se transfirió a un tubo Eppendorf estéril con capacidad de 1.5 ml y se centrifugó a 13,000 xg durante 5 minutos; después se tomó el sobrenadante (fase acuosa) y se repitió el paso anterior.

---

<sup>1</sup> Sigma-Aldrich, EUA.

<sup>2</sup> Sigma-Aldrich, EUA.

<sup>3</sup> J.T Baker, EUA.

<sup>4</sup> J.T Baker, EUA.

<sup>5</sup> Baker Analyzed, EUA.

Al volver a tomar el sobrenadante se agregaron 750  $\mu$ l de etanol al 100%, se centrifugó a 13,000 xg durante 10 min y se decantó el sobrenadante. Posteriormente, se lavó el ADN con 1 ml de etanol al 70% y se repitió la centrifugación a 13,000 xg por 10 min. Para finalizar, se dejó secar el ADN a temperatura ambiente y se resuspendió con 100  $\mu$ l de agua desionizada estéril. La muestra se conservó en refrigeración o congelación hasta su uso.

La extracción se corroboró por medio de electroforesis en gel de agarosa<sup>6</sup> al 1% teñido con una solución de bromuro de etidio<sup>7</sup> (0.1  $\mu$ g/ml) y se expuso a luz ultravioleta para la visualización del material genético y su registro fotográfico electrónico (Figuras 5 y 6).

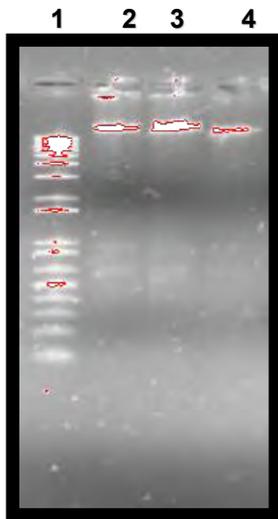


Figura 5. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, DNA genómico de la cepa Hond Utrecht IV. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular 1Kb plus, en el carril 2, 3 y 4 se observa el material genético

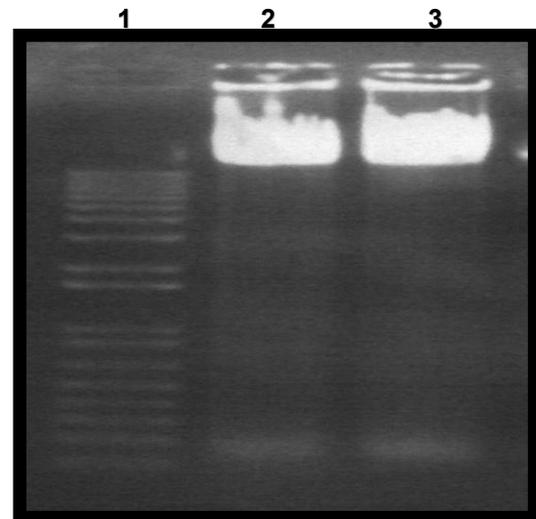


Figura 6. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, DNA genómico de la cepa LOCaS 46. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular 1Kb plus, en el carril 2 y 3 se observa el material genético.

---

<sup>6</sup>Invitrogen, EUA.

<sup>7</sup>Gilbco BRL, EUA.

### 5.3 Concentración de ADN.

La concentración de ADN de leptospira se determinó por medio de espectrofotometría (Espectrofotómetro Ultrospec 3000 UV/Visible) con una absorbancia de 260 nm. En una cubeta de cuarzo se realizó una dilución 1/1000 del material genético con agua bidestilada estéril y se siguió la siguiente fórmula para obtener la concentración en µg/ml.

(lectura de la absorbancia a 260 nm) \* (factor del espectrofotómetro = 50) \* (factor de dilución del ADN)

### 5.4 Síntesis de iniciadores.

Con la finalidad de amplificar el locus *gsp* de las cepas Hond Utrecht IV y LOCaS 46 se diseñaron iniciadores con una longitud de 18 pares de bases (pb) para lo cual se tomó como referencia la secuencia de dicho *locus* de *Leptospira interrogans* serovariedad Copenhageni cepa Fiocruz (Nascimento *et al.*, 2004), ya que esta serovariedad y las estudiadas pertenecen a la misma especie. Los iniciadores se sintetizaron en el Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México ubicado en Cuernavaca, Morelos (Apéndice 2).

### 5.5 Reacción en cadena de la polimerasa.

El proceso de esta técnica consistió en una síntesis continua y bidireccional, por medio de extensión de iniciadores de una región de ADN específica (Dieffenbach, 2003). La reacción consta de 3 etapas:

**Desnaturalización:** Se llevó a cabo por el calentamiento del ADN blanco a 94 C favoreciendo así, el rompimiento de los puentes de hidrógeno que unen las bases del ADN.

**Alineamiento:** Consiste en la unión de los iniciadores al ADN molde a temperaturas que fueron de los 48 C a 56 C para los iniciadores diseñados.

**Extensión:** Dada por la Taq polimerasa a la temperatura óptima de 72 C. Para esta fase, se tuvo como molde el ADN de las dos cepas en estudio. Las reacciones se realizaron en un termociclador Thermo PCR Sprint Therman Cycler en volúmenes de 50 µl, utilizando 2 unidades de la enzima Taq DNA Polimerasa<sup>1</sup> en cada mezcla, 1 µl de una mezcla 10 mM de dNTPs<sup>1</sup>, 2.5 µl de solución amortiguadora para PCR (10X)<sup>1</sup>, 4 µl de una solución de 25 Mm MgCl<sup>1</sup> y 1 µl de cada iniciador con una concentración aproximada de 10 pmol. Los productos de la reacción fueron evaluados en gel de agarosa al 1% para su posterior precipitación.

## **5.6 Precipitación de ADN.**

Para un volumen de 45 µl de reacción de PCR se agregaron 10 – 12 µl de cloruro de sodio<sup>2</sup> (NaCl) 4M; 50 – 56 µl de una solución al 13% polietilenglicol (PEG 8000<sup>3</sup>), se mezcló e incubó en hielo durante 20 min. Posteriormente, se centrifugó a 8,000 xg a 4 C durante 20 minutos. Se decantó y limpió el precipitado con etanol 70% frío y se centrifugó nuevamente. Seguido a este paso, se decantó nuevamente, se secó el precipitado a temperatura ambiente y se disolvió el DNA precipitado con 25 µl de agua bidestilada esterilizada por autoclave (Sambrook and Rosell, 2001).

---

<sup>1</sup> Roche Applied Science, Alemania

<sup>2</sup> Golden Bell, EUA

<sup>3</sup> J.T Baker, EUA

### **5.7 Secuenciación.**

Los productos de la PCR fueron enviados a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM ubicado en Cuernavaca Morelos.

### **5.8 Análisis *in silico*.**

Los resultados de las secuencias generadas fueron alineados y analizados con el programa Sequencher 4.5. Posteriormente, el *locus gsp* fue analizado con el programa Basic Local Alignment Search Tool (blast-n) del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Se realizó un análisis de cada uno de los genes que componen el *locus gsp* describiendo el número de pares de bases que lo conforman, número de aminoácidos, función de la proteína codificada, punto isoeléctrico, peso molecular, así como una comparación entre las cepas de estudio así como con las serovariedades Lai, Copenhageni, Hardjobovis, Patoc y otro microorganismo Gram negativo como *E.coli*, *Vibrio* y *Pseudomonas*.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Cultivo.

Cada serovariedad se cultivo en 100 ml de Medio líquido EMJH a 30 C durante 15 días hasta que se alcanzó la turbidez de 0.5 según el nefelómetro de McFarland y se procedió a realizar la extracción de ADN. Todos los días se revisaban los cultivos para corroborar el desarrollo bacteriano así como para verificar que no existiera contaminación del cultivo.

### 6.2 Concentración de ADN.

Después de aplicar el método de tiocianato de guanidina (Figura 7) para la obtención de ADN, ambas cepas se diluyeron en agua bidestilada estéril 1/1000, en el espectrofotómetro se observó una concentración de 0.013 $\mu$ g a una longitud de onda de 260nm, el factor es constante, y en este caso es de 50. Por lo tanto:

$$(0.013) (50) (1000) = 650\mu\text{g}/1000\mu\text{l} = 0.65\mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Así, en este caso la concentración de ADN es de 0.65 $\mu$ g por cada  $\mu$ l de muestra.

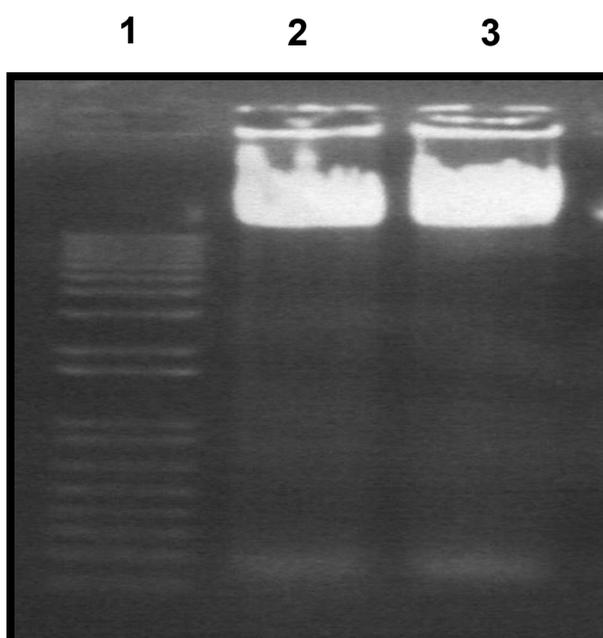


Figura 7. Observación de ADN. En el carril 1 se colocaron 3  $\mu$ l de MPM 1Kb plus (1 $\mu$ g/ $\mu$ l). Carril 2, 3 $\mu$ l de ADN genómico de la cepa Hond Utrecht IV. Carril 3, 3  $\mu$ l de ADN genómico de la cepa LOCaS

### 6.3 PCR.

Para esta técnica se amplificaron 21 productos de PCR de aproximadamente 1.5 kb secuenciados en el Instituto de Biotecnología, UNAM (Apéndice 3). Cada uno los cuales se alinearon y empalmaron 42 lecturas totales con el programa Sequencher 4.5 para su posterior análisis *in silico* (Apéndice 4). La visualización de los productos amplificados se corroboró por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (Figura 8).

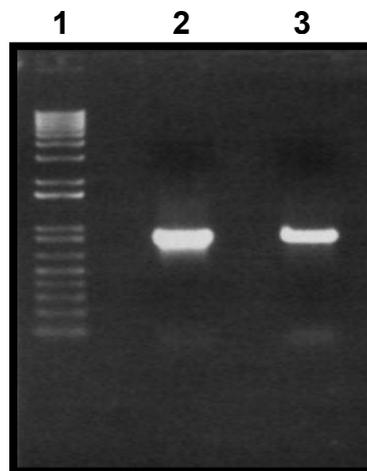


Figura 8. Observación de productos de PCR En el carril 1 se colocaron 3  $\mu$ l de MPM 1Kb plus (1 $\mu$ g/ $\mu$ l). Carril 2: 3 $\mu$ l de producto de PCR, amplificación de 1.5 kb del gen *gspD* cepa Hond Utrecht IV. Carril 3: 3 $\mu$ l de producto de PCR, amplificación de 1.5kb del gen *gspD* cepa LOCaS46

### 6.4 Análisis *in silico*.

Al realizar un análisis de los genes *gsp*, se determinó que el *locus gsp* tiene una longitud de 15,346 pb, conformado por 17 genes, los cuales se describen a continuación.

### ***gspA***

Es el primer componente del *locus gsp*; lo conforman 375 pb, las cuales codifican para una proteína de 124 aa, con un punto isoeléctrico de 5.31 y un peso molecular de 30.7 kD.

### ***gspB***

Este gen es el segundo componente del *locus gsp*, consta de 1,011 pb, las cuales codifican para un producto de 336 aa, la proteína está clasificada como una peptidasa con un punto isoeléctrico de 5.11 y un peso molecular de 83.7 kD.

### ***gspC***

El gen *gspC* es el tercero del *locus gsp*; se encuentra conformado por 909 pb que codifica para un producto de 302 aa con un punto isoeléctrico de 74409.1 y un peso molecular de 5.14 kD.

### ***gspD***

Es el cuarto gen que compone *el locus gsp*, consta de 1,791 pb que codifica para un producto de 596 aa, presenta un punto isoeléctrico de 5.00 y un peso molecular de 63kD.

### ***gspE***

Es el quinto elemento que forma el *locus gsp*, consta de 1674 pb, las cuales codifican para un producto de 557 aa; dicho producto se conoce como la proteína GspE con un punto isoeléctrico de 4.92 y un peso molecular de 139.2kD.

### ***gspF***

Es el sexto gen del *locus gsp*, está constituido por 1227 pb que codifican para un producto de 408 aa. La proteína presenta un punto isoeléctrico de 5.08 y un peso molecular de 101.5 kD.

### ***gspG***

Es el séptimo componente del *locus gsp*, lo componen 477 pb que codifican para un producto de 158 aa. La proteína presenta un punto isoeléctrico de 5.07 y un peso molecular de 38.9 kD

### ***gspH***

Es el octavo gen que compone el *locus gsp*, está formado por 570 pb que codifican para un producto de 189 aa. La proteína H presenta un punto isoeléctrico de 5.22 y un peso molecular de 47.3 kD.

### ***gspI***

Es el noveno gen *gsp*, que consta de 537 pb, las cuales codifican para un producto de 178 aa. Esta proteína presente un punto isoeléctrico de 5.22 y un peso molecular de 44 kD.

### ***gspJ***

Es el décimo gen del *locus gsp*, esta formado por 645 pb que codifican para un producto de 214 aa. La proteína presenta un punto isoeléctrico de 5.21 y un peso molecular de 53.3 kD.

### ***gspK***

Es el gen once del *locus gsp*, compuesto por 1176 pb, las cuales codifican para un producto de 391 aa. Esta proteína presenta un punto isoeléctrico de 5.00 y un peso molecular de 96.5 kD.

### ***EspI***

Es el doceavo gen que compone el *locus gsp*, está formado por 1623 pb, que codifican para un producto de 540 pb, con un punto isoeléctrico de 5.05 y un peso molecular de 134.7 kD.

### ***gspM***

Es el treceavo componente del *locus gsp*, consta de 528 pares de bases que codifican para un producto de 175 aa, con un punto isoeléctrico de 5.26 y un peso molecular de 42.9 kD.

### ***gspN***

Es el gen número 14 del *locus gsp*, formado por 942 pb que codifican para un producto de 313 aa, tiene un punto isoeléctrico de 5.15 y un peso molecular de 78 kD.

### ***gspO***

Es el componente 15 del *locus gsp*, esto en las serovariedades Lai, Copenhageni y las cepas Hond Utrecht IV y LOCaS 46, ya que en la serovariedad Hardjobovis y Patoc sólo está compuesto por 14 genes. Este gen esta conformado por 744 pb que codifican para un producto de 247aa con un punto isoeléctrico de 5.18 y un peso molecular de 61.5 kD.

### ***gspP***

Es el penúltimo gen que compone el *locus gsp*, consta de 228 pb que codifica para un producto de 76 aa con un punto isoeléctrico de 5.15 y un peso molecular de 19.3 kD.

## ***gspQ***

Es el último gen que compone el *locus gsp*, conformado por 267 pb que codifican para un producto de 89 aa con un punto isoeléctrico de 5.39 y un peso molecular de 21.9 kD.

Al realizar las comparaciones entre ambas cepas mostraron una identidad del 99% entre sí, al igual que con las SVs Copenhageni y Lai, del 89% con la SV Hardjobovis y 75% con la serovariedad Patoc. Al realizar los alineamientos de las 2 cepas a estudiar se realizaron comparaciones con el programa blast-n de cada gen con las serovariedades Copenhageni, Lai, Hardjobovis, Patoc y otro microorganismo Gram negativo. A continuación se mencionan las identidades encontradas entre las cepas estudiadas y otro microorganismo Gram negativo (Cuadro 6), así mismo en los cuadros 7, 8, 9 y 10 se muestran las identidades observadas de pb y aa con otras serovariedades de *Leptospira*.

Gen	Identidad entre cepas Hond Utrecht IV y LOCaS 46	Microorganismo Gram negativo
<i>gspA</i>	99%	<i>E.coli</i> : 22%
<i>gspB</i>	100%	<i>E.coli</i> : 25%
<i>gspC</i>	99%	<i>E.coli</i> : 27%
<i>gspD</i>	100%	<i>E.coli</i> : 41%   33%   38%   36%   40%   31%   66%
<i>gspE</i>	99%	<i>E.coli</i> : 43%
<i>gspF</i>	100%	<i>Pseudomonas sp</i> : 29%
<i>gspG</i>	99%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> : 51%
<i>gspH</i>	99%	<i>Vibrio fischeri</i> : 34%
<i>gspI</i>	99%	<i>Pseudomonas fluorescens</i> : 33%
<i>gspJ</i>	100%	<i>Vibrio sp</i> : 24%
<i>gspK</i>	99%	<i>E.coli</i> : 27%
<i>gspL</i>	99%	<i>E.coli</i> : 22%
<i>gspM</i>	99%	<i>E.coli</i> : 31%
<i>gspN</i>	100%	<i>Vibrio sp</i> : 23%
<i>gspO</i>	99%	Sin identidad
<i>gspP</i>	99%	Sin identidad
<i>gspQ</i>	99%	Sin identidad

Cuadro 6. Identidades realizadas entre las cepas Hond Utrecht IV, LOCaS 46 y un microorganismo Gram negativo con el programa blast-n

Gen	Copenhageni		Lai		Hardjobovis		Patoc			
	Blast-n		Blast-n		Blast-n		Blast-n			
<i>gspA</i>	99%	99%	98%	99%	86%	82%	S/I			
<i>gspB</i>	99%		99%		83%		S/I			
<i>gspC</i>	98%		98%		81%		76%			
<i>gspD</i>	99%		99%		82%		75%	75%	87%	72%
<i>gspE</i>	99%		99%		84%		73%			
<i>gspF</i>	98%		98%		83%		77%	80%	77%	
<i>gspG</i>	98%		98%		85%		S/I			
<i>gspH</i>	98%		99%		83%		S/I			
<i>gspI</i>	99%		98%		83%		S/I			
<i>gspJ</i>	99%		99%		81%		81%			
<i>gspK</i>	99%		99%		83%		79%		76%	
<i>gspL</i>	99%	99%	99%	99%	80%		S/I			
<i>gspM</i>	99%		99%		82%		S/I			
<i>gspN</i>	99%		99%		82%		81%			
<i>gspO</i>	99%		99%		S/I		S/I			
<i>gspP</i>	99%		99%		S/I		S/I			
<i>gspQ</i>	99%		99%		S/I		S/I			

Cuadro 7. Porcentajes de identidad de pares de bases de la cepa Hond Utrecht IV con serovariedades de *Leptospira*

**S/I: Sin Identidad**

Gen	Copenhageni		Lai		Hardjobovis		Patoc			
	Blast-n		Blast-n		Blast-n		Blast-n			
<i>gspA</i>	99%	99%	98%	99%	86%	82%	S/I			
<i>gspB</i>	99%		99%		83%		S/I			
<i>gspC</i>	98%		98%		82%		76%			
<i>gspD</i>	99%		99%		82%		75%	75%	87%	72%
<i>gspE</i>	99%		99%		84%		73%			
<i>gspF</i>	98%		98%		83%		77%	80%	77%	
<i>gspG</i>	98%		97%		85%		S/I			
<i>gspH</i>	98%		98%		83%		S/I			
<i>gspI</i>	99%		98%		83%		S/I			
<i>gspJ</i>	99%		99%		81%		81%			
<i>gspK</i>	99%		99%		83%		79%	76%		
<i>gspL</i>	99%	99%	99%	99%	81%		S/I			
<i>gspM</i>	99%		99%		83%		S/I			
<i>gspN</i>	99%		99%		82%		81%			
<i>gspO</i>	99%		99%		S/I		S/I			
<i>gspP</i>	99%		99%		S/I		S/I			
<i>gspQ</i>	99%		99%		S/I		S/I			

Cuadro 8. Porcentajes de identidad de pares de bases de la cepa LOCaS 46 con serovariedades de *Leptospira*

**S/I: Sin Identidad**

<b>Proteína</b>	<b>Copenhageni</b>	<b>Lai</b>	<b>Hardjobivis</b>	<b>Patoc</b>
	<b>Blast-n</b>	<b>Blast-n</b>	<b>Blast-n</b>	<b>Blast-n</b>
GspA	100%	99%	90%	39%
GspB	99%	99%	88%	44%
GspC	99%	99%	86%	52%
GspD	99%	99%	92%	62%
GspE	99%	99%	94%	71%
GspF	99%	99%	95%	65%
GspG	98%	98%	96%	48%
GspH	100%	99%	91%	31%
GspI	98%	98%	88%	48%
GspJ	99%	99%	87%	56%
GspK	99%	99%	89%	66%
GspL	99%	99%	87%	43%
GspM	100%	100%	91%	49%
GspN	100%	100%	87%	33%
GspO	99%	99%	S/I	S/I
GspP	99%	99%	S/I	S/I
GspQ	99%	99%	S/I	S/I

Cuadro 9. Porcentajes de identidad de aminoácidos de la cepa Hond Utrecht IV con serovariedades de *Leptospira*

**S/I: Sin Identidad**

<b>Proteína</b>	<b>Copenhageni</b>	<b>Lai</b>	<b>Hardjobovis</b>	<b>Patoc</b>
	<b>Blast-n</b>	<b>Blast-n</b>	<b>Blast-n</b>	<b>Blast-n</b>
GspA	100%	99%	90%	39%
GspB	99%	99%	88%	44%
GspC	99%	99%	86%	52%
GspD	99%	99%	92%	62%
GspE	99%	99%	94%	71%
GspF	99%	99%	95%	65%
GspG	97%	97%	95%	47%
GspH	100%	99%	91%	31%
GspI	98%	98%	88%	48%
GspJ	99%	99%	87%	56%
GSpK	99%	99%	89%	66%
GspL	99%	99%	87%	43%
GspM	100%	100%	91%	49%
GspN	100%	100%	87%	33%
GspO	99%	99%	S/I	S/I
GspP	99%	99%	S/I	S/I
GspQ	99%	99%	S/I	S/I

Cuadro 10. Porcentajes de identidad de aminoácidos de la cepa LOCaS 46 con serovariedades de *Leptospira*

**S/I: Sin Identidad**

## 7. DISCUSIÓN

La obtención del genoma completo de la especie patógena *Leptospira interrogans* serovariedades Copenhageni cepa Fiocruz (Nascimento *et al.*, 2004), Lai cepa 56601 (Ren *et al.*, 2003) y *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjobovis cepa L550 (Bulach *et al.*, 2006), así como de la especie saprófita *Leptospira biflexa* serovariedad Patoc cepa Patoc 1 (Picardeu *et al.*, 2008); son importantes herramientas de investigación para el avance de los estudios y entendimiento sobre las propiedades antigénicas, las bases patogénicas y otras propiedades de este género bacteriano.

En este trabajo se obtuvo la secuencia completa del *locus gsp* de *Leptospira interrogans* serovareidad Canicola cepas Hond Utrecht IV y LOCaS 46, el cual codifica para las proteínas pertenecientes al Sistema de Secreción Tipo 2. Así mismo, se realizó un estudio comparativo con las serovareidades Copenhageni, Lai, Hardjobovis y Patoc para determinar la organización genética de este grupo de genes.

Se ha reportado la existencia de este *locus* en varios géneros bacterianos, entre los cuales se pueden mencionar *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras; en donde la translocación de proteínas a través del Sistema de Secreción Tipo 2 requiere de 12 a 16 proteínas codificadas por el *locus gsp*, dependiendo de la especie (Johnson *et al.*, 2006, Sandkvist, 2001).

En *Leptospira interrogans* serovareidad Canicola cepas Hond Utrecht IV y LOCaS 46, el *locus gsp* está conformado por 17 genes al igual que la serovareidad Copenhageni y Lai, mientras que en las serovareidades Patoc y Hardjobovis este *locus* sólo está conformado por 14 genes.

La proteína GspA es un componente de la membrana interna identificada como una lipoproteína en las serovariedades Lai, Copenhageni, Hardjobovis y Patoc

(Ren *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 2004; Bulach *et al.*, 2006; Picardeau *et al.*, 2008). La proteína GspA, tiene cierta actividad de ATPasa, y sólo se ha detectado en *Escherichia coli* y *A. hydrophila* (*exeA*) (Condemine and Shevchik, 2000). Ahora se sabe que el género *Leptospira* también presenta este gen que conforma el T2S. Cabe señalar que GspA junto con la proteína GspB forman un complejo indispensable para que se lleve a cabo la secreción por este sistema.

La proteína GspB se encuentra anclada a la membrana interna y en contacto con la secretina GspD, sirviendo también como soporte y estabilización y buen funcionamiento de las proteínas que componen al T2S (Condemine and Shevchik, 2000; Sandkvist, 2001). En *Erwinia chrysanthemi* se sugiere que esta proteína regula la secreción por medio del paso de energía junto con GspA, para así ayudar a abrir el poro de secreción (Howard *et al.*, 1996).

La proteína GspC del T2S interactúa con membranas tanto de la membrana interna como de la membrana externa, esta interacción se cree puede estar involucrada en el paso de energía para la exportación de las proteínas entre *gspS* y *gspD*, así como en el reconocimiento del sustrato y la formación de un puente entre la membrana interna y la membrana externa (Johnson *et al.*, 1999; Possot *et al.*, 1999 Sandkvist, 2001).

En *Vibrio cholerae*, se ha estudiado esta proteína así como su estructura tridimensional y se reporta la presencia de 2 dominios, el dominio HR, el cual es el responsable de la interacción con la secretina GspD, y la región PDZ, la cual se cree interactúa con las proteínas que se van a secretar (Korotkov *et al.*, 2006).

La proteína GspD forma parte de la familia de las secretinas y se encuentra anclada en la membrana externa en forma de anillo compuesto por 12 estructuras con un diámetro interno de 7.6nm (Nowen *et al.*, 1999). Se encuentra conservada entre los diferentes sistemas tipo 2, el cual también es un componente del T3S y del proceso de polimerización del Pili tipo IV (Sandkvist, 2001; Lee and Schneewind, 2001).

La inserción de la secretina en la membrana externa depende de la interacción con la lipoproteína GspS específicamente en los aminoácidos 62 C- terminal interviniendo también en la inhibición de la degradación proteolítica; se ha propuesto que GspS también puede ser parte del complejo de la secretina. Nowen *et al.*, 1999). También se sugiere que GspD interviene de manera directa en el reconocimiento del sustrato por medio del dominio N-terminal (Shevchik *et al.*, 1997).

GspE es una proteína catalogada como una ATPasa, se encuentra en 2 formas, una asociada a la membrana citoplasmática y otra en el citoplasma; la forma asociada a la membrana se encuentra interaccionando directamente con la proteína GspL en el dominio N-terminal, esta interacción se ha reportado incrementa la actividad de hidrólisis de ATP en *Xanthomonas campestris* (Sandkvist, 2001; Shiue *et al.*, 2006). En *Vibrio cholerae* también se ha demostrado esta interacción, la cual es fundamental para la translocación de toxinas a través de la membrana externa (Sandkvist *et al.*, 1995). La proteína GspE se encuentra en el citoplasma en forma de monómero y una vez que se une al ATP se une a GspL en la membrana citoplasmática, esta unión permite la fosforilación del ATP así como la estabilización de los componentes del T2S (Shiue *et al.*, 2006).

Estudios hechos con *Erwinia chrysanthemi* muestran que GspF es una proteína que se encuentra anclada a la membrana citoplasmática con un dominio N-terminal citoplasmático seguido de una pequeña asa citoplasmática y un largo dominio C-terminal citoplasmático. La proteína GspF se encuentra relacionada con GspE, GspL y GspM formando una plataforma, la cual presumiblemente es usada para el ensamblaje de otros componentes del T2S (Py *et al.*, 2001). Recientemente Abendroth *et al.*, publicaron la estructura tridimensional de los dominios citoplasmáticos de GspF en *Vibrio cholerae*.

Las proteínas GspG, H, I, J, K son similares a las subunidades estructurales del pili tipo IV llamadas pilinas, por lo que se han denominado pseudopilinas. Estos

componentes son esenciales para la translocación de proteínas del periplasma al espacio extracelular dado por el T2S en bacterias Gram negativas (Nien-Tai *et al.*, 2002). Estas proteínas se ensamblan para formar una estructura que se propone es la que conecta a la membrana citoplasmática con la superficie celular, así como la responsable de conducir las proteínas a través de la secretina GspD, actuando como un pistón que empuja las proteínas a través de la secretina; la proteína GspG es el componente mayoritario de este complejo; estos estudios se han realizado en *Klebsiella oxytoca*, *Xanthomonas campestris* y *Vibrio cholerae*. El modelo del pistón fue propuesto por primera vez por Hobbs y Mattick en 1993 (Nien-Tai *et al.*, 2002; Yanez *et al.*, 2008).

*GspL* es una proteína forma parte de la plataforma formada por las proteínas E, F y M localizadas en la membrana interna, interactúa directamente con la ATPasa GspE en su dominio N-terminal (Sandkvist *et al.*, 1995; Py *et al.*, 1999).

Se ha demostrado que en *Xanthomonas campestris*, *Vibrio cholerae* y *Erwinia chrysanthemi* la función principal de esta proteína es estimular la hidrólisis de ATP por medio de la proteína GspE (Sandkvist *et al.*, 1995; Shiue *et al.*, 2002; Py *et al.*, 2001).

Se demostró que en *Xanthomonas campestris*, *Vibrio cholerae*, GspM se encuentra localizada en la membrana interna formando parte de la plataforma junto con las proteínas GsPL, E y F, esta proteína es la encargada de regular la secreción extracelular comunicando la información de hidrólisis de ATP entre la membrana interna y la secretina GspD (Py, *et al.*, 2001; Sandkvist, 2001).

GspN es otro componente de la membrana interna y en contacto con la Proteína M y la secretina GspD (Sandkvist, 2001).

GspO es una proteína situada en la membrana interna y su función es procesar a las proteínas GspG, H, I, J y K para formar una estructura en forma de pilus y cuyo componente mayoritario GspG.

No se ha reportado la función de GspP, sin embargo forma parte de este importante grupo de proteínas que componen el T2S, de igual forma se desconoce la función de GspQ en el funcionamiento del T2S, se muestra como una proteína hipotética perteneciente al *locus gsp*.

## 8. CONCLUSIONES

Con lo anterior se concluye que existe una diferencia significativa entre las cepas patógenas y apatógenas, en el caso de la serovariedad Hardjobovis, a pesar de ser patógena, muestra un decremento en su porcentaje de identidad y se cree que es debido a la pérdida de material genético que ha sufrido durante su evolución así como el hecho de que pertenece a la especie *borgpetersenii*.

En cuanto a las cepas Hond Utrecht IV y LOCaS 46 los 17 genes que componen el *locus gsp* se encuentran altamente conservados debido a que pertenecen a la especie *interrogans*.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abendroth J, Mitchell DD, Korotkov KV , Johnson TL, Kreger A, Sandkvist M, Hol WG. The three-dimensional structure of the cytoplasmic domains of EpsF from the type 2 secretion system of *Vibrio cholerae*. J Struct Biol 2009; 166:303-315.
2. Adler B and De la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and Leptospirosis. Vet Microbiol 2009.
3. Alcaraz SLE. Detección *in situ* de la expresión de GspD, la supuesta secretina del SST-II de *Leptospira*, mediante la prueba de inmunohistoquímica (Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción y Salud Animal) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2008
4. 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.
5. Biberstein EL, Zee YC. Tratado de Microbiología Veterinaria. 2° edición. Editorial Acribia S.A, España., 1990.
6. Bingle LEH, Bailey CM, Pallen M. Type VI secretion: a beginner's guide. Current Opinion Microbiol 2008; 11: 3-8.
7. Bolin AC, Prescott JF. Leptospirosis. In: Howard JL, Smith RA. Current Veterinary Therapy. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1999; 325-358.
8. Bromley DB, Charon NW. Axial filament involvement in the motility of *Leptospira* interrogans. J Bacteriol 1979; 137:1406-1412.
9. Brooks GF, Botel JS, Morse SA. Microbiología Médica de Jawetz Melnick y Adelberg. 18° ed. El Manual Moderno, México, 2004.
10. Buchanan SK. Type I secretion and multidrug efflux: Transport through the TolC channel-tunnel. Trends Biochem 2001; 26: 3-6.
11. Bulach DM, Zuerner R, Wilson P, Seemann T, McGrath A, Cullen PA, Davis J, Johnson M, Kuczek E, Alt DP, Peterson-Burch B, Coppel R, Rood JI, Davies JK and Adler B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. PNAS 2006; 103: 14560-14565.

12. Cameron CE, Zuerner RL, Raverty S, Colegrove KM, Norman SA, Lambourn DM, Jeffries SJ, Gullan FM. Detection of Pathogenic *Leptospira* Bacteria in Pinniped Populations via PCR and identification of a Source of Transmission for Zoonotic Leptospirosis in the Marine Environment. *J. Microbiol* 2008; 46:1728-1733.
13. Carmona-Gasca CA, Hartskeerl R, Ahmed N, León LL, Vado SI, Alejandro de la Peña-Moctezuma. Tipificación de cepas de *Leptospira* aisladas en México, por Secuenciación de Loci Múltiples (MLST). Memorias del VI Congreso Internacional de Epidemiología AMEV, 2009. Ixtapan de la Sal, Edo. de México. Octubre 14 al 17, 2009.
14. Carter GR, Chengappa MM. Bacteriología y Micología Veterinarias: Aspectos esenciales. 2° ed. El Manual Moderno, México, 1994.
15. Castillo SLO. Detección de perros portadores de leptospiras patógenas: estudios bacteriológico, serológico, histopatológico y molecular (Tesis de licenciatura) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2008.
16. Christie PJ, Vogel JP. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol* 2000; 8: 354-360.
17. Cianciotto NP. Type II secretion: a protein secretion system for all seasons – Review. *TRENDS Microbiol* 2005;13: 581-588.
18. Condemine G and Shevchik VE. Overproduction of the secretin OutD suppresses the secretion defect of an *Erwinia chrysanthemi* outB mutant. *Microbiol* 2000; 146: 639-647.
19. Cullen PA, Cordwell SJ, Bulach DM, Haake DA, Adler B. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect Immun* 2002; 70: 2311-2318.
20. Cullen PA, Haake DA, Bulach DM, Zuerner RL, Adler B. LipL21 Is a Novel Surface-Exposed Lipoprotein of Pathogenic *Leptospira* Species. *Infect Immun* 2003; 71: 2414-2421.

21. De la Peña-Moctezuma A. Studies on the genetic organization of the *rfb* loci of *Leptospira interrogans* serovars. (PhD Thesis). Australia Melbourne, Victoria: Monash Melbourne University, 2002.
22. Desvaux M, Parham NJ, Scott TA, Henderson IR. The general secretory pathway: a general misnomer?. *TRENDS in Microbiology* 2004; 12:306 – 315.
23. Dieffenbach CW, Dveksler GA. PCR Primer. A Laboratory Manual. 2° ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, E.U.A., 2003.
24. Driessen AJM and Nouwen N. Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane – Review. *Annu Rev. Biochem* 2008; 77: 2.1-2.25.
25. Erosa-Barbachano A. Leptospirosis. *Historia de la Medicina. Rev Biomed* 2001; 12:282-287.
26. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. 2a. Ed. Melbourne, Australia: MediSci 1999.
27. Fisher JA, Favreau MB. Plasmid Purification by Phenol extraction from Guanidinium Thiocyanate Solution: Development of an automated protocol. *Anal Biochem* 2001; 194: 309-315.
28. Flores PEO. Estudio del *locus gsp* del Sistema de Transporte Tipo II de *Leptospira Interrogans* serovariedad Icterohaemorrhagiae (Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción y Salud Animal) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2006.
29. Galán JE, Collmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for proteína delivery into host cells. *Science* 1999; 248: 1322-1328,
30. González- Pedrajo B, Dreyfus G. Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram-negativas: Biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. *Mensaje Bioquímico*, Vol XXVII. Depto Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 2003.
31. Grooms DL. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhoea virus and leptospirosis. *Theriogenology* 2006; 66: 624-628.

32. Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Reis MG, Levett PN, Ko AI, Haake DA. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to Leptospirosis in humans. *Infect and Immun* 2001; 69:4958-4968.
33. 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.
34. 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-long-phase growth and mammalian infection. *Infect Immun* 1998; 66: 1579-1587.
35. Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett J, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin C. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* 2000; 68: 2276-2285.
36. Haake DA. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiol* 2000; 146: 1491-1504.
37. Haake DA and Matsunaga J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. *Infect Immun* 2002; 70: 4936-4945.
38. Henderson IR, Navarro-García F, Nataro JP. The great escape: Structure and function of the autotransporter proteins. *Trend Microbiol* 1998; 6: 370-378.
39. Hirsh DC, McLachlan NJ, Walker RL. *Veterinary Microbiology*. 2<sup>o</sup> ed. Blackwell Publishing, E.U.A., 2004.
40. Johnson RC, Wilson JB. Nutrition of *Leptospira Pomona*. *J. Bacteriol* 1960; 80: 406:411.
41. Hobbs M and Mattick JS. Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein secretion

- apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. *Mol Microbiol* 1993; 10: 233-243.
42. Howard SP, Meiklejohn HG, Shivak D, Jahagirdar R. A tonB-like protein and a novel membrane protein containing an ATP-binding cassette function together in exotoxin secretion. *Mol Microbiol* 1996; 22: 595-604.
  43. Johnson TL, Abendroth J, Hol GJ, Sandkvist M. Type II secretion: from structure to function – Minireview. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 255:175-186.
  44. Kiozumi N, Watanabe H. Leptospirosis Vaccines: Past, Present and Future. *J Postgrad Med* 2005; 51:210-4.
  45. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 736-747.
  46. Korotkov KV, Krumm B, Bagdasarian M, Hol WG. Structural and functional studies of EpsC, a crucial component of the type 2 secretion system from *Vibrio cholerae*. *Mol Biol* 2006; 363: 311-321.
  47. Koster M, Bitter W, Tommassen SJ. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Op Cell Biol* 2000; 12: 420-430
  48. Lee VT and Schneewind O. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes Dev* 2001; 15: 1725-1752.
  49. León-Lara L. Epidemiología, prevención y control de la leptospirosis en los animales domésticos. En: Rodríguez Vivaz RI. *Enfermedades de Importancia Económica en Producción Animal*. McGraw-Hill, México 2005: 489-504.
  50. Levett P. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 296-326.
  51. Macnab RM. The bacterial flagellum: Reversible Rotary propellor and type III export apparatus. *J Bacteriol* 1999; 181: 7149-7153.
  52. Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE. *Enfermedades Infecciosas. Principios y prácticas*. Tomo II. 3° edición. Edit. Médica Panamericana, Argentina., 1991.

53. Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sánchez 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.
54. Mena BR. Análisis *in silico* de los genes *gspDL* y *gspEL* del sistema de secreción tipo-II de *Leptospira biflexa* serovariedad Patoc (Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción y Salud Animal) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2006.
55. Monahan AM, Callanan JJ, Nally JE. Review paper: Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. *Vet Pathol* 2009; 46: 792-799.
56. Nascimento A, Ko A, Martins EAL, Monteiro VCB, *et al.* Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *Journal of Bacteriology* 2004; 186: 2164–2172.
57. Nien-Tai HU, Wei-Ming LEU, Meng-Shiunn L, Avon C, Shu-Chung C, Yu-Ling S, Ling-Yun C. XpsG, the major pseudopilin in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, forms a pilus-like structure between cytoplasmic and outer membranes. *Biochem J* 2002; 365: 205-211.
58. Nouwen N, Ranson N, Saibil H, Wolpensinger B, Engel A, Ghazi A, Pugsley P. Secretin PulD: Association with pilot PulS, structure, and ion-conducting channel formation. *Microbiol* 1999; 96: 8173-8177.
59. Palaniappan UM, Yung-Fu C, Jusuf SD, Artiushin S, Timoney JF, McDonough SP, Barr SC, Divers BT, Simpson KW, McDonough PL, Mohammed HO. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 2002; 70: 5924-5930.
60. PasteurInstitut.org (homepage on the Internet) Paris: Unité de Bactériologie Moléculaire et Médicale, 2006. Available from: <http://www.pasteur.fr/recherche/Leptospira/Leptospira.html>.

61. Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson PJ, Creno S, Kuczek ES, Bommezzadri S, Davis JC, McGrath A, Johnson MJ, Boursaux-Eude C, Seemann T, Rouy Z, Me'digue C, Adler B. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS ONE* 2008; 3: 1607-1616.
62. Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid extraction of genomic DNA with guanidinium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* 1989; 8:151-156.
63. Pugsley AP. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol* 1993; 57: 50-108.
64. Pugsley AP, Francetic O, Possot OM, Sauvonnnet N; Hardie KR. Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative bacteria – Review. *Gene* 1997; 192: 13-19.
65. Py B, Loiseau L, Barras F. An inner membrane platform in the type II secretion machinery of Gram-negative bacteria. *EMBO* 2001; 2: 244-248.
66. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Blackwell Publishing, E.U.A., 2002.
67. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. *Medicina Veterinaria, Tratado de las Enfermedades del Ganado Bovino, Ovino, Porcino, Caprino y Equino*. 9° ed. McGraw-Hill Interamericana. Vol. I, España, 1999.
68. 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, Wank M, Huangk HL, Qian Z, Wang SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QC, Guo XK, Danchinq A, Girons IS, Somerville RL, Wen YM, Shik MH, Chen Z, Xuk JG, Zhao GP. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole – genome sequencing. *Nature* 2003; 422:888-893.
69. Ristow P, Bourhy P, Kerneis S, Schmitt C, Prevost MC, Lienbaum W, Picardeau M. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *J Microbiol* 2008; 154: 1309-1317.

70. Robien MA, Krumm BE, Sandkvist M, Hol WG. Crystal structure of the extracellular protein secretion NTPase EpsE of *Vibrio cholerae*. J Mol Biol 2003; 333: 657-674.
71. Rodríguez REA. GspD, una proteína del sistema de secreción tipo II de *L. borgpetersenii* y su asociación con inmunidad y patogenicidad (Tesis de Doctorado en Ciencias de la Producción y Salud Animal) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2008.
72. Sambrook J, Rosell D. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 3° ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, E.U.A., 2001.
73. Sandkvist M, Bagdasarian M, Howard SP, DiRita VJ. Interaction between the autokinase EpsE and EpsL in the cytoplasmic membrane is required for extracellular secretion in *Vibrio Cholerae*. EMBO J 1995; 14: 1664-1673.
74. Sandkvist M. Type II Secretion and Pathogenesis – Minireview. Infect Immun 2001; 69: 3523-3535.
75. Shang ES, Summers TA, Haake DA. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. Infect Immun 1996; 64: 2322-2330.
76. Shevchik EV, Robert-Baudouy J, Condemine G. Specific interaction between OutD, an *Erwinia chrysanthemi* outer membrane protein of the general secretory pathway, and secreted proteins. EMBO J 1997; 16: 3007-3016.
77. Shiue SJ, Kao KM, Leu WM, Chen LY, Cahn NL, Hu NT. XpsE oligomerization triggered by ATP binding, not hydrolysis, leads to its association with XpsL. EMBO J 2006; 25: 1426-1435.
78. Smith CR, Ketterer PJ, McGowan MR, Corning BG. A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in cattle. Aust Vet J. 1994; 71: 290-294.
79. Stalheim OHV, Wilson JB. Cultivation of Leptospirae. Nutrition of *Leptospira canicola*. J Bacteriol 1964; 88: 48-54.
80. Stathopoulos C, Hendrixson DR, Thanassi DG, Hultgren S, Joseph W, Curtiss R. Secretion of virulence determinants by the general secretory

pathway in Gram-negative pathogens: an evolving story – Review. *Microbes and Infection* 2000; 2: 1061-1072.

81. Thanassi DG, Hultgren SJ. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Cell Biol* 2000; 12: 420-430.
82. Vignon G, Kohler R, Larquet E, Giroux S, Prevost MC, Roux P, Pugsley AP. Type IV-like pili formed by the type II secretion system: specificity, composition, bundling, polar localization and surface presentation of peptides. *J. Bacteriol* 2003; 185: 3416-3428.
83. Viprey V, Del Greco A, Golinowski W, Broughton WJ, Perret X. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Mol Microbiol* 1998; 8: 123-131.
84. Yanez ME, Korotkova KV, Abendroth J, Hol WGJ. Structure of the minor pseudopilin EpsH from the type 2 secretion system of *Vibrio cholerae*. *J. Mol Biol* 2008; 377: 91-103.

## APÉNDICE 1

### Medio de cultivo Ellinghausen-McCullough modificado por Johnson y Harrison (EMJH)

Para 1 litro:

#### Base.

En 800ml de agua destilada estéril, agregar:

- 1.0 gr de fosfato de sodio ( $\text{NaHPO}_4$ )
- 0.3 gr de fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- 1.0 gr de cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ )
- 1.0 ml de cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (2.5gr/10ml)
- 1.0 ml de piruvato de sodio (1.0gr/10ml)
- 1.0 ml de glicerina 10% (1.0ml/10ml)

#### Solución Albúmina y Tween 80.

- 0.7 ml de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}$ ) (0.15gr/10ml)
- 1.0 ml de sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ) (0.04gr/10ml)
- 1.0 ml de sulfato de manganeso ( $\text{MnSO}_4$ ) (0.01gr/10ml)
- 1.0 ml de tiamina (0.05gr/10ml)
- 0.7 ml de cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}$ ) (0.15gr/10ml)
- 0.5 ml de glicerol 20% (2.0ml/10ml)
- 0.2 ml de cianocobalamina (Vit.  $\text{B}_{12}$ ) (0.02gr/10ml)
- 0.1 ml de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) (0.03gr/10ml)
- 0.2 gr de piruvato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COCO}_2\text{Na}$ )
- 0.1 gr de acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )

#### Solución Tween 80 y Sulfato ferroso.

- 60 ml de agua destilada estéril
- 0.01 gr de sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ )
- 1.25 ml de Tween 80

**Nota: Antes de adicionar la solución Tween 80 y Sulfato Ferroso, añadir 10.0 gr de Albúmina Sérica Bovina fracción 5 (ABS V) y dejar que se disuelva completamente.**

Ajustar el pH a 7.2 – 7.4 y filtrar de manera no estéril con prefiltro de 0.65  $\mu\text{m}$ , 0.45  $\mu\text{m}$  y 0.22  $\mu\text{m}$ .

Filtrar en la campana de extracción con filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ . Dejar en prueba de esterilidad por 2 días en estufa a 37°C.

## APÉNDICE 2

### Lista de iniciadores utilizados para la PCR

Clave	Orientación	Composición nucleotídica 5' - 3'	pb
MILL2464	A	TGA TTC GTA AAG ACG CGG	18
MILL2465	R	TTA CCA TTG ATC AAC GCG	18
BAP2377	A	GAG TCG TAT CCT TTG CCG	18
BAP2367	R	TCT TTA TGG CCA ACC GCC	18
MILL2468	A	AGA AGC TCA GAA TTT GCG	18
MILL2469	A	GAA AGA AAG CCT CCA CCG	18
MILL2470	R	TTT CGT TGA CCG CTT GGG	18
BAP2380	R	GAA GTA ATC AGA TAG GGC	18
BAP2379	A	AAC GGA TCG TAA TGA GGC	18
BAP2369	R	ATC AAA AGA CCC ATA ACC	18
BAP2402	A	ACT TCG GAA CTA GAG TCC	18
BAP2401	R	AGT TCC TGA ATC TGA GGG	18
MILL2471	A	AGT TTC CGT CTC TCG TCG	18
MILL2472	R	TTT AAA GTT TGT GCC GCG	18
MILL2473	A	TCC GGA AAG GAT TTA CCC	18
MILL2474	R	TCC AGT AAA GAT AAC GCC	18
BAP2381	A	GTT ACG ATC AAA TAT CCC	18
BAP2371	R	ACT TGA CCA ACC GCT ACG	18
BAP2398	R	TTT TCT CGT TTG ATA CCG	18
MILL2475	A	AAC TCT TGC GTT TCC TGG	18
MILL2476	R	GTA TTC GTT CCA TAA TCG	18
BAP2397	A	AAG AGT CAA AAC CAA AGG	18
BAP2396	R	AAA TTC GTT CAC TCT TCC	18
MILL2477	A	TCT AAC GGA TCA GAT CGC	18
MILL2478	R	TCA GCG CAG TTT CTT CCG	18
MILL2464	A	TGA TTC GTA AAG ACG CGG	18
MILL2465	R	TTA CCA TTG ATC AAC GCG	18
BAP2377	A	GAG TCG TAT CCT TTG CCG	18
BAP2367	R	TCT TTA TGG CCA ACC GCC	18
MILL2468	A	AGA AGC TCA GAA TTT GCG	18
MILL2469	A	GAA AGA AAG CCT CCA CCG	18
MILL2470	R	TTT CGT TGA CCG CTT GGG	18
MILL2466	A	TAA TAC ATC TTC TGC CGC	18
BAP2380	R	GAA GTA ATC AGA TAG GGC	18
BAP2371	R	ACT TGA CCA ACC GCT ACG	18
MILL2474	R	TCC AGT AAA GAT AAC GCC	18
BAP2381	A	GTT ACG ATC AAA TAT CCC	18
BAP2371	R	ACT TGA CCA ACC GCT ACG	18
MILL2475	A	AAC TCT TGC GTT TCC TGG	18
MILL2476	R	GTA TTC GTT CCA TAA TCG	18
BAP2397	A	AAG AGT CAA AAC CAA AGG	18
BAP2396	R	AAA TTC GTT CAC TCT TCC	18

MAL: Marco Abierto de Lectura

MILL: Microbiología e Inmunología. *Leptospira* y Leptospirosis

BAP: Ben Adler Project

## APÉNDICE 3

### Secuencias obtenidas de los genes de los loci *gsp* de *Leptospira interrogans* serovariedad *Canicola* cepas *LOCas46* y *Hond Utrecht IV*

#### *gspA*

##### **LOCas 46**

ATGTTTCGTATTGCCGTTTTCTGCTTCCCTCAGTTTTTATTTTTCTGGCAGGTTGCCGTAACAGATTGATTCGTAAAGACGCGGTRGCTCAGATTAATGAGCATTATTCGGAAAAAATTTATTACCTAACAAAAGATAAAAGGTTTTCTAATACAGAAACCTTTAAGAAAAGGGATGCTCGTTCGGATTTACGTGGAATCAACTCCTTCGATGGTGAAAAATTAATGTTACCCTGCGGATCATAAAAAGAGAATACGCCATCGGAAGAATGATCCTTTATCAATTGAATGACGAATATAGCGGTAAAAAAATTTACTGTAGAAGATTTGGATAAACTTATAGCCAATGAACTTGTGGAATACAAAAAGAAAAATAA

MFR<sup>1</sup>IAVFL<sup>1</sup>LP<sup>1</sup>SV<sup>1</sup>FI<sup>1</sup>FLAGCGNRLIRKDAVAQINEHYSEKIYYLTKDKKVSNTETF<sup>1</sup>FKK<sup>1</sup>GLVRIYVESTPS  
MVKIKCYPADHKREYAIGRM<sup>1</sup>ILYQLNDEYS<sup>1</sup>SGKKITVEDLDKLIANELVEYK<sup>1</sup>KKK

##### **Hond Utrecht IV**

ATGTTTCGTATTGCCGTTTTCTGCTTCCCTCAGTTTTTATTTTTCTGGCAGGTTGCCGTAACAGATTGATTCGTAAAGACGCGGTRGCTCAGATTAATGAGCATTATTCGGAAAAAATTTATTACCTAACAAAAGATAAAAGGTTTTCTAATACAGAAACCTTTAARAAAAGGGATGCTCGTTCGGATTTACGTGGAATCRACTCCTTCGATGGTGAAAAATTAATGTTACCCTGCGGATCATAAAAAGAGAATACGCCATCGGAAGAATGATCCTTTATCAATTGAATGACGAATATAGCGGTAAAAAAATTTACTGTAGAAGATTTGGATAAACTTATAGCCAATGAACTTGTGGAATACAAAAAGAAAAATAA

MFR<sup>1</sup>IAVFL<sup>1</sup>LP<sup>1</sup>SV<sup>1</sup>FI<sup>1</sup>FLAGCGNRLIRKDAVAQINEHYSEKIYYLTKDKKVSNTETF<sup>1</sup>FKK<sup>1</sup>GLVRIYVESTPS  
MVKIKCYPADHKREYAIGRM<sup>1</sup>ILYQLNDEYS<sup>1</sup>SGKKITVEDLDKLIANELVEY

#### *gspB*

##### **LOCas 46**

ATGAACTTGTGGAATACAAAAAGAAAAATAAATCCTCGAGAAGTGGAGGATCAAGATCGGATGTATCTGAATCCGATACTAAAAAAGTGAACGGGAAACTTTTTTTTTATTTTTTTGATTTCTACTTGGTGTTCGGTCTATTTTTGCGGACCCTCTGAAAAATTACGACGCAGAAATTCAGAATATACCAATAAGGATTCCTCCTTTTCCGATAAGGAAGAACGTAAAAATTAACAACATTTTTCTCAATCTCCTGAAAATTGGCAGGAAGAAAATATTCTCTCAATTATCACAAAGACAAATCTAACTTAGAACCTCCAGTTTTATCAATGTCAATAGGATATCTCTTCTAAGATCGTTAACCACAGTGAATCATATATAAAAAATTATGTAGTCAAACCCAAGGATTCCTTTCTAAAAATTGCAAGAGAAAATGAAAACCTTCGGTTCAAAAAATCGTTTTCTGCCAACGGCTTGAAAAAGATTCAACTCTTCAAGTGGGGCTGAATCTTTCCATTCCGGTGCAGGTTTCGTAACGCGAGTCGAGAAAAAGTAGAATCCATAAAATTAATTTGTACATCCTGTTTTAAATGCAAGAGTCACCTCTCGTTATGGAAGAAGAAAATGATCCGTTTCATACTGGTTCGGGTGGCTTYCATAACCGTTTTGGATTTTGCCTGGGGCTCAAGGCGCTCCGATCCTTGCGTCTGCCGATGGARTCGTATCCTTTGCCGGGGTGAACGGAGGATATGGAATACTGTAATYATAGATCATGATAACGGCTATAAAAACAATGTATGCTCACTGCTCTAAAATTACAATTGAACAGGGAAC TAGAGTGAGTACTGGAACGGTCATAGGTGCAATCGGCAGGACCGGGTCGGCTACGGGACCTCATCTTCATTTGAAGTCTTTTTAAATGGGAATAGAGTAAATCCAGACGTCGCTTTGAAAAAGCGTTAAAGATTGTGACTCCTTTAGACCCTGGTAAATTTGCTAGATTGTGA

MNLWNTKRKNKSSRSRSDVSESDTKKVNGLFFIFLISYLVFGSIFADPLKNYDAEISEYTNKDSSEFSDKEERKIKQLFSQSPENWQEEKYSLNYHKDKSNLELPSFINVNRIISSKIVNHSGIIYKNYVVKPKDSLKSIAREM<sup>1</sup>KTSVQKIVSANG<sup>1</sup>LKKNSTLQVGLNLSIPVQVRNASREKVEFHKLFVHPVLNARVTSRYGRKDPFH<sup>1</sup>TGSGGFHTGLDFAGA<sup>1</sup>QGAPILASADGX<sup>1</sup>VSFAGVNGGYNTV<sup>1</sup>IIDHDNGYK<sup>1</sup>TM<sup>1</sup>AHCSKITIEQ<sup>1</sup>GTRVSTGTVIGAI<sup>1</sup>GRTGSATGPHLHFEVFLNGNRVNP<sup>1</sup>DVALKKALKIVT<sup>1</sup>PLDPGKFARL

##### **Hond Utrecht IV**

ATGAACTTGTGGAATACAAAAAGAAAAATAAATCCTCGAGAAGTGGAGGATCAAGATCGGATGTATCTGAATCCGATACTAAAAAAGTGAACGGGAAACTTTTTTTTTATTTTTTTGATTTCTACTTGGTGTTCGGTCTATTTTTGCGGACCCTCTGAAAAATTACGACGCAGAAATTCAGAATATACCAATAAGGATTCCTCCTTT

TTTTCCGATAAGGAAGAACGTAAAATTAACAACACTATTTTCTCAATCTCCTGAAAATTGGCAGGAAGAAA  
AATATTCTCTCAATTATCACAAAGACAAATCTAACTTAGAACCTCCAGTTTTATCAATGTCAATAGGAT  
TATCTCTTCTAAGATCGTTAACCACAGTGGAAATCATATATAAAAAATTATGTAGTCAAACCCAAGGATTCT  
CTTTCTAAAAATTGCAAGAGAAAAAGAAAATTCGGTTCAAAAAATCGTTTTCTGCCAACGGCTTGAAAAAGA  
ATTCAACTCTTCAAGTGGGGCTGAATCTTTCCATTCGGGTGCAGGTTTCGTAACGCGAGTCGAGAAAAAGT  
AGAATTCATAAAATATTTGTACATCCTGTTTTAAATGCAAGAGTCACTTCTCGTTATGGAAGAAGAAAA  
GATCCGTTTCATACTGGTTCGGGTGGCTTYCATACCGTTTTGGATTTTGC TGGGGCTCAAGGCGCTCCGA  
TCCTTGGCTCTGCCGATGGARTCGTATCCTTTGCCGGGTGAACGGAGGATATGGAATACTGTAATYAT  
AGATCATGATAACGGCTATAAAACAATGTATGCTCACTGCTCTAAAAATTACAATTGAACAGGGAAC TAGA  
GTGAGTACTGGAACGGTCATAGGTGCAATCGGCAGGACCGGGTCGGCTACGGGACCTCATCTTCATTTTG  
AAGTCTTTTTAAATGGGAATAGAGTAAATCCAGACGTCGCTTTGAAAAAGCGTTAAAGATTGTGACTCC  
TTTAGACCCTGGTAAATTTGCTAGATTGTGA

MNLWNTKRKNKSSRSRSDVSESDTKKVNGLFFIFLISYLVFGSIFADPLKNYDAEISEYTNKDSSF  
FSDKEERKIKQLFSQSPENWQEEKYSLNYHKDKSNLELPSFINVNRIISSKIVNHSGIYKKNYVVKPKDS  
LSKIAREMKT SVQKIVSANGLKKNSTLQVGLNLSIPVQVRNASREKVEFHKL FVHPVLNARVTSRYGRRK  
DPFH TSGSGFHTGLDFAGA QGAPILASADGXVSFAGVNGGYNTVIIDHDNGYKTM YAHCSKITIEQGTR  
VSTGTVIGAI GRTGSATGPHLHFEVFLNGNRVNP DVALKKALKIVT PLDPGKFARL

## **gspC**

### **LOCaS 46**

ATGAACCGGATTTTTTTAGAACTCAGGAAAAATACATTTTATACTCTCATTCCAGTTATTTTATTTTTTT  
CTTATTCACTTTCTTATCTTTTAAGAGCGGTGATTCTTGCCTTTTTTGAATCCGAGTATTCAGGCCGCGAG  
TTCCGGAACAAAATCCGATTCGCAAAGTAGGTTTGAAAAC TACAAATCGATCTCTTTCTTCTTATGAGGAA  
ATGGTTC AAGGAAAATTTAATTCGTGGAATGATTCCTAAAGAAGGAGAAAATTTCTACAGAAGGAGAAAATTT  
CTGCGGCTTCTGCTCCACCAGATACGGGAGAAGGAGAAGAAAATGAAAATTACCGGAACCTTAAGTGGTCA  
TTGGTCTTTTGTCTGTTACGATTTAGAAAAAGGAAAAGCAGAAGCTCAGGAATTTGCGATTGGAGAA  
ACAGTAGGTGGGTATAAAATCCGTTCTATTTCTCTCAACTATGTAGTTTTGGAAAAAAGTGGAAATTTCTC  
TCAAAGTAGAAAATCCGTCAAAATCCGGGGGAAGCAAGGGCCAAGTTGAATTTAGACGCTGGTCCAAAAAC  
GGAAGGTGGACCTCTCGCGGGTGATACGGTTCGTAAAGTTCTTTCTAGGCAAGATGTAAACCGTAAGTTG  
AAAGACCAAGCGGCGATCTTTAAAAATGCGAGATTTGGCCCCGCGTTGATCAATGGTAAAATTTCCGGTT  
ATAAAAATCTATAGTGTACTCCGGAACATATCTTTTATTCCTTAGGAGCTAGAAATGGAGATATTATCAA  
ACGAGTAAATGGAATGCCGTTGACCGAAAACCGAAAAATGTTAGAGATCTGGGGAGCTGTAAAAACTGCC  
GATAAGATTACAGTAGATGTGGAAAAGAGGTAGCCAGATTTCTCACCTACGAATTTATTATCAGAAACTAA

MNAIFLELRKNTFYTLIPVILFFSYLSYLLRAVILAFNLPSIQ AASSGNTNPIRKVGLLETTNRS  
LSSYEEMVQGNLIRGMI PKEGEI STEGEISAASAPPD TGEGEEMKITG TLSGHSFARVTIVEK  
GKAEAEQFAI GETVGGYKIRSISLNYVVLEKSGISLKVEIGQTPGEARAKLNLDAGPKTEGGPL  
AGD TVRKVLSRQDVNRKLDQAAIFKNARFGPALINGKISGYKIYSVTP EHFYSLGARNGDII  
KRVNGMPLTETETEKMLEI WGAVK TADKITVDVERGSQILTYEFII RN

### **Hond Utrecht IV**

ATGAACCGGATTTTTTTAGAACTCAGGAAAAATACATTTTATACTCTCATTCCAGTTATTTTATTTTTTT  
CTTATTCACTTTCTTATCTTTTAAGAGCGGTGATTCTTGCCTTTTTTGAATCCGAGTATTCAGGCCGCGAG  
TTCCGGAACAAAATCCGATTCGCAAAGTAGGTTTGAAAAC TACAAATCGATCTCTTTCTTCTTATGAGGAA  
ATGGTTC AAGGAAAATTTAATTCGTGGAATGATTCCTAAAGAAGGAGAAAATTTCTACAGAAGGAGAAAATTT  
CKGCGGCTTCTGCTCCACCAGATACGGGAGAAGGAGAAGAAAATGAAAATTACCGGAACCTTAAGTGGTCA  
TTGGTCTTTTGTCTGTYTACGATTTAGAAAAAGGAAAAGCAGAAGCKCAGGAATTTGCGATTGGAGAA  
ACRGTAGGTGGGTATAAAATCCGTTCTATTTCTCTCAACTATGTAGTTTTGGAAAAAAGTGGAAATTTCTC  
TCAAAGTAGAAAATCCGTCAAAATCCGGGGGAAGCAAGGGCCAAGTTGAATTTAGACGCTGGTCCAAAAAC  
GGAAGGTGGACCTCTCGCGGGTGATACGGTTCGTAAAGTTCTTTCTAGGCAAGATGTAAACCGTAAGTTG  
AAAGACCAAGCGGCGATCTTTAAAAATGCGAGATTTGGCCCCGCGTTGATCAATGGTAAAATTTCCGGTT  
ATAAAAATCTATAGTGTACTCCGGAACATATCTTTTATTCCTTAGGAGCTAGAAATGGAGATATTATCAA  
ACGAGTAAATGGAATGCCGTTGACCGAAAACCGAAAAATGTTAGAGATCTGGGGAGCTGTAAAAACTGCC  
GATAAGATTACAGTAGATGTGGAAAAGAGGTAGCCAGATTTCTCACCTACGAATTTATTATCAGAAACTAA

MNAIFLELRKNTFYTLIPVILFFSYLSYLLRAVILAFLNPSIQAASSGTPNPIRKVGLTETNRS  
LSSYEEMVQGNLIRGMIIPKEGEISTEGEISAASAPPDGTGEGEEMKITGTLSGHWSFARXTIVEK  
GKAEAQEFAIGETVGGYKIRSISLNYVVLEKSGISLKVEIGQTPGEARAKLNLNDAGPKTEGGPL  
AGDTPVRKVLRSQDVNRKLDQAAIFKNARFGPALINGKISGYKIYSVTPEHIFYSLGARNGDI I  
KRVNGMPLTETEKMLEIWGAVKTADKITVDVERGSQILTYEFIIRN

## ***gspD***

### **LOCs 46**

ATGTCGGAAACAATCAGTCAACTTTCAATCTTTAGAAATATTCTCCCTTCTCATACTTTTGTTTTTAGTAT  
GGGACAAACCAGTCTTTCTCAAAGTAAGAAAAAACTTCCGCAAAGACAAAATCGGTTACTCAAGAAGA  
ACCTTCGGAAAAAACTTTCTATGCAAATGGAGAGATACAGAATAAACGACTTTCTCAAAGGAATGAGC  
GCCATTTTAAAGAAAAATATTCTTTTAGATGAAAGTTTAAAAGGTAAAAAATTACGATCATTCTCAA  
AGGAAATTCGGATCAAAAATGGATTTATCTTTATGAAATCTGTTTTAGAAATCCCTAGGTTTCGGAGTAGT  
AGAAGAACCGGATCTCATTTCGATTGTTAAAAATAAAGATGCGCTTGCTAGATCTCCTATCGTTAGGGTC  
GGAAAAAATGATTCCCGAAGAGGAAGTTGGAGATTATAGAACGATTACTCAGGTCAATTCCTATTGAAA  
ATGTAACCAGAAAGAAATAGAACCTATTTTAAAACGCTTACTTCTCCTAATACGGATGTGATCGTTTA  
TAGAAATACAAAATACGATTGTACTTTCAGGTTCCGCCGACACATCAATAAATTTGTTGGTACTTGTAAGC  
GAATTTGACGTCAAAAATCGAAGAGGCGACTCCAGGATCGATTTCATCGGCAGGTGATATTCATATTTATA  
CTTTGGAATACAGTGAGGCTGAAAAATCGCGGCGACTTTAGTTAAGTTAGACAATCCTGTGATTCAGTC  
TGAAGATCTGAGTCTGAAAGAAAGCTCCACCGCCAGGGCAACCTATGCCTAAGGTAGATAAGATCAAG  
GCGGTTGGCCATAAAGAAATCCAATTCGTGATTGTTACGGCGACAAATGCGGAATGGGCAGAAATCCGTA  
AAATCATTAAGGTTTTGGATTCAGCTAGAAAACAGGTTTTATTAGAAGTTTTGATCGTGGAACTTACTTC  
CAGCGATTTAAACGATTTTCGGGATCGATTGGAGATATAAGGGGGAAGCTTTCGGTCAATTCATCTGGT  
CTTTCTAAAGAACGGAATATATCAATTCGAACGGTTCAGGTCAATCCGAACATAAACACTCTGAGTGGTT  
TCTCTTAGGATTTTTAAAAGCTGGTTCGGAACAAATCATAGGAATTTTAAAGCGCAATCAAGGAAATGA  
AACTTTAACGTGTATCTGCTCCTCAAGTGTCTACAGTAGATAATCAAGAAGCAGAAATCAGTGTGGGT  
CAAGCAATGCCCCGTCGAACTCAGAGTAGGAACGCGAGTACTGGTGGAACGAACGCTGTAACCGTGGACA  
ATTACGAATCTCGTCTACTGTATCAAATTAAGTTTACTCCTCACGTGAACAAAAATAAATAAGATCAC  
TCTCGAACTCTTTCAGGAGATTAAAAATATCGCAGAGATTGCTCTCGCCGAGGAAACCTACTTTCAAT  
CGAAGAGAAATTA AAACTTCTATCTCAATTGAAAACACTCAATCTATCGTGATCGGTGGATTGATTTCGA  
ACGATAAAACAAAAAGAAATCATTAAAAATTCCTTTTCTAGGAGACATTCGGTATTTAGGTCATCTTTTTAA  
AAGAACTACTGAAAAAATTA AAAAGACCAACTTGATGGTTTTTATTACGCCGCATATACTCGATAGTAGA  
GAGACTGCGGATAAGATGACTGTTAAGAAAAAATGCAGCARGAACGTTACGAACTCGAGAGAGAAAGAA  
TCCTCAACAAAGAAAGAGAAATCAGAGAAAAGAGGGGATTAA

MSGTISQLSIFRIFSLILLFLVWDKPVFPQSKKTSAKTKSVTQEEPSEKTFYANWRDTELND  
FLKMSAILKKNILLDESLKGGKITIIISQKEIPIKNGFIFMKSVLLESLGFGVVEEPDLISIVKI  
KDALARSPIVRVGKELIPEEEVGDYRTITQVIPIENVKPEELEPILKRLTSPNTDVIVYRNTNT  
IVLSGSAADINKLLVLVSEFDVKIEEATPGS ISSAGDIHIYTTYSEAEKIAATLVKLDNPVIQ  
SEDLSSERKPPPPGQMPKVDKIKAVGHKESNSVIVTATNAEWAEIRKIIKVLD SARKQVLLV  
LIVELTSSDLNDFGIDWRYKGEAFGQFNSGLSKEANI INSNQVNPNIINTLSGFSGLGFLKAGSE  
QIIGILSANQGNENFNVL SAPQVLTVDNQEAEISVGQDVPVRTQSRNAGTGGTNAVTVDNYEYR  
PTGIKLFKFTPHVNKNNKITLLELFQEIKNIAEIALAGGNPTFNRREIKTSSIENTQSIVIGGLI  
SNDKQKRIIKIPFLGDIPYLGHLFKRTTEKIKKTNLMVFITPHILDSRETADKMTVKKKMQQER  
YELERERILNKEREIRERGD

### **Hond Utrecht IV**

ATGTCGGAAACAATCAGTCAACTTTCAATCTTTAGAAATATTCTCCCTTCTCATACTTTTGTTTTTAGTAT  
GGGACAAACCAGTCTTTCTCAAAGTAAGAAAAAACTTCCGCAAAGACAAAATCGGTTACTCAAGAAGA  
ACCTTCGGAAAAAACTTTCTATGCAAATGGAGAGATACAGAATAAACGACTTTCTCAAAGGAATGAGC  
GCCATTTTAAAGAAAAATATTCTTTTAGATGAAAGTTTAAAAGGTAAAAAATTACGATCATTCTCAA  
AGGAAATTCGGATCAAAAATGGATTTATCTTTATGAAATCTGTTTTAGAAATCCCTAGGTTTCGGAGTAGT  
AGAAGAACCGGATCTCATTTCGATTGTTAAAAATAAAGATGCGCTTGCTAGATCTCCTATCGTTAGGGTC  
GGAAAAAATGATTCCCGAAGAGGAAGTTGGAGATTATAGAACGATTACTCAGGTCAATTCCTATTGAAA  
ATGTAACCAGAAAGAAATAGAACCTATTTTAAAACGCTTACTTCTCCTAATACGGATGTGATCGTTTA  
TAGAAATACAAAATACGATTGTACTTTCAGGTTCCGCCGACACATCAATAAATTTGTTGGTACTTGTAAGC  
GAATTTGACGTCAAAAATCGAAGAGGCGACTCCAGGATCGATTTCATCGGCAGGTGATATTCATATTTATA  
CTTTGGAATACAGTGAGGCTGAAAAAATCGCGGCGACTTTAGTTAAGTTAGACAATCCTGTGATTCAGTC

TGAAGATCTGAGTTCTGAAAGAAAGCCTCCACCGCCAGGGCAACCTATGCCTAAGGTAGATAAGATCAAG  
GCGGTTGGCCATAAAGAATCCAATTCGTGATTGTTACGGCGACAAATGCGGAATGGGCAGAAATCCGTA  
AAATCATTAAGGTTTTGGATTACAGCTAGAAAACAGGTTTTATTAGAAGTTTTGATCGTGGAACCTACTTC  
CAGCGATTTAAACGATTTTCGGGATCGATTGGAGATATAAGGGGGAAGCTTTTCGGTCAATTCATTTCTGGT  
CTTTCTAAAGAAGCGAATATTATCAATTCGAACGGTCAGGTCAATCCGAACATAAACTCTGAGTGGTT  
TCTCTTTAGGATTTTTAAAGCTGGTTCGGAACAAATCATAGGAATTTTAAGCGCCAATCAAGGAAATGA  
AACTTTAACGTGTTATCTGCTCCTCAAGTGCTTACAGTAGATAATCAAGAAGCAGAAATCAGTGTGGGT  
CAAGACGTGCCCGTTCGAACTCAGAGTAGGAACGCAGGTACTGGTGGAACGAACGCTGTAACCGTGGACA  
ATTACGAATATCGTCTACTGGTATCAAACCTAAGTTTACTCCTCACGTGAACAAAAATAAAGATCAC  
TCTCGAACTCTTTCAGGAGATTAAAAATATCGCAGAGATTGCTCTCGCCGGAGGAAACCTACTTTCAAT  
CGAAGAGAAATTAAGCTTCTATCTCAATTGAAAACACTCAATCTATCGTGATCGGTGGATTGATTTCGA  
ACGATAAACAAAAAGAAATCATTAATAATTCCTTTTCTAGGAGACATTCCGTATTTAGGTCATCTTTTTAA  
AAGAACTACTGAAAAAATTAAGAACCAACTTGATGGTTTTTATTACGCCGCATATACTCGATAGTAGA  
GAGACTGCGGATAAGATGACTGTTAAGAAAAAATGCAGCARGAACGTTACGAACTCGAGAGAGAAAGAA  
TCCTCAACAAAGAAAGAGAAATCAGAGAAAAGAGGGGATTA

MSGTISQLSIFRIFSLILLFLVWDKVPFPQSKKTSAKTKSVTQEPESEKTFYANWRDTELND  
FLKGM SAILKKNILLDESLKGGKITIISQKEIPIKNGFIFMKS VLES LGFVVEEPDLISIVKI  
KDALARSPIVRVGKELIPEEEVGDYRTITQVIPIENVKPEELEPIPKRLTSPNTDVIVYRNTNT  
IVLSGSAADINKLLVLVSEFVKIEEATPGS ISSAGDIHIY TLEYSEAEKIAATLVKLDNPVIQ  
SEDLSSERKPPPPGQPM PKVDKIKAVGHKESNSVIVTATNAEWAEIRKIKVLD SARKQVLLV  
LIVELTSSDLNDFGIDWRYKGEAFGQFNSGLSKEANI INSNQVNPININTLSGFLGFLKAGSE  
QIIGILSANQGNENFNVL SAPQVLTVDNQEA EISVQDVPVRTQSRNAGTGGTNAVTVDNYEYR  
PTGIKLFKFTPHVNKNKNTLEL FQEIKNIAEIALAGGNPTFNRREIKTSISIENTQSIVIGGLI  
SNDKQKRIIKIPFLGDI PYLGH LFKRTTEKIKKTNLMVFITPHILDSRETADKMTVKKKMQQER  
YELERERILNKEREIRERGD

## ***gspE***

### **LOCaS 46**

TTGAAAACCTCTCGGAGATATCCTAATCGAAGAGGGGATCATATCTGAAAAGATCTGGAAGATTCCTAA  
AGGTTTCAGAAAAAACAACCTTCCACTCAGTCATATCATTCAGAAAAAGGAATCGCCGGAGAAGCAGA  
TATTCTCCGCGCCTATCCAAACTCTATCAACTCGARTTCAGAGAAAAGTTAGAGTTTACGGGTATGGAA  
GAAATATTTTTACAAATTCCTCTAAAACCTATTCAGAAAAGTAGAATCGTTCGGTTTTCTTTCTAAAA  
AAACAATTCGAATTGCTGTATCCGATCCTTCTGATTTACATCCGATGGATGACGCTCGTAACTTTCTAAA  
AGGTTACAACGTRGAATTTATTTCTCGCTCCGGAACCGGAGATCATGAGAATTTATTCATTTCTATTTGAT  
AATACATCTTCTGCCGCCAAAGAGATGTTAAATGAGATGGAGGGAAGTTTTTTCAGAACTTCGGGAAGCCT  
TTGAAAATGAAAACCTGGATCTAAGCGATGACGCTCCGATCATCAAAATGGTCAACGTGATCCTTTCCCA  
AGCGGTCAACGAAAAGGCTTTCGGATATTCACATTTGAACCTTACGAAAAGTCTCTCGTGGTTCGCTATCGT  
GTGGATGGTATTTTGCATAACGTGCTTAGTCCCTCAAATCGTATCACGCGGGTATTTCTTCCAGAATCA  
AGATCATGTCTAATTTGAACATCGCTGAAAATAGACTTCTCAAGACGGAAGGATCAAACCTAGATTGGC  
TGGTAAGGATATAGATATCCGGGTTTCCACCATTCTTGTGAGTTCGGGAGAACGGATCGTAATGAGGCTT  
TTGAATAAAACGGATCAAAAAGTATTTCTTTAGATACGATGGGTTTTTATCCAGAATTAATCCAGTCTTTGC  
GTTTCGTTAATTTACGAACCTCATGGAATCATTTTAGTAACGGGACCGACCGGATCGGGTAAGTCTACTAC  
ATTATATTCTGCGTTAAGCGAACTCAATACAGAAGAAAGAAACATCATCACCTGCGAAGATCCTGTGGAA  
TATCAGATTGAAGGAATTTCTCAAATGCAAATGCAGGAAAAAATTTGGTCTTACGTTTGAACCTGGACTTC  
GAGCCATCCTTCGACAAGACCCGACGTTATCATGGTAGGTGAGATTCGAGATGAAGAAACCGCAAGAAT  
CGCGATCCAAGCTTCTCTGACCGGTACCTTGTTTTTTCTACGTTTACACAAAACGATGCAGCAAGTGCC  
GCGACTCGTTTTCGATCGATATGGGAATCGAGCCCTATCTGATTACTTCCACAGTATTAGGATTTATGGCTC  
AAAGACTTGTAAGAGTTATCTGCACTCAATGTAAAGAAACGTATAAACCTACCCTTCGGAACCTAGAGTC  
CATTGGCATCTCTAAAAAATTTTTAAAGAACGGTAACCTTACATCGTGGTAAAGGTTGTTCTCATTTGATG  
GGAACCTGGTTTTAAAGGTAGAATCGGAATTTATGAACTTTTACTTGTAAATTTCTCCTCTCAAACAAGCAA  
TTCTTCATGGTAAAGACGCTGGACAGTTAAACGAAATCGCCCTCGAACATGAGTTTCAAACCTCTAAAAGA  
TTATGGAATTAGAAAAGTAATCGATGGTGTAACTACAATCGACGAAGTTCTCAGGGTAACTTAA

LKTLGDILIEEGLISEKDLDSLKVQKKNLPLSHI IQKKG IAGEADILRALSKLYQLEFREKL  
EFTGMEEIFLQIPLKLIQKSRIVPFLSKKTIRIAVSDPSDLHPMDDARNFLKGYNVEFILAPE  
PEIMRIIHSFNDTSSAAKEMLNEMEGSFSELAFAFENETLDSLDDAPIIKMVNVI LSQAVNER  
ASDIHIEPYEKSLVVRYRVDGILHNVLSPPKSYHAGISSRIKIMSNLNIAENRLPQDGRICKRL

AGKDIDIRVSTIPCQFGERIVMRLLNKTDQKYSLDTMGFYPELIQSLRSLIYEPHGIILVTGPT  
GSGKSTTLYSALSELNTEERNIITCEDPVEYQIEGISQMOMEKIGLTFATGLRAILRQDPDVI  
MVGEIRDEETARIAIQASLTGHLVSTLHTNDAASAATRLIDMGIEPYLITSTVLGMAQRLVR  
VICTQCKETYKPTTSELESIGISKKFLKNGNLHRGKGC SHCMGTGFKGRIGIYELLVNSPLKQ  
AILHGKDAGQLNEIALEHEFQTLKDYGIRKVIDGVTTIDEVLRVT

**Hond Utrecht IV**

TTGAAAACCTCTCGGAGATATCCTAATCGAAGAGGGGATCATATCTGAAAAAGATCTGGAAGATTCCTTAA  
AGGTTTCAGAAAAAACAACCTTCCACTCAGTCATATCATTCAGAAAAAGGAATCGCCGGAGAAGCAGA  
TATTCTCCGCGCCCTATCCAAACTCTATCAACTCGARTTCAGAGAAAAGTTAGAGTTTACGGGTATGGAA  
GAAATATTTTTACAAATTCCTCTAAAACCTCATTCAGAAAAGTAGAATCGTTCGGTTTTCTCTTTCTAAAA  
AAACAATTCGAATTGCTGTATCCGATCCTTCTGATTTACATCCGATGGATGACGCTCGTAACTTTCTAAA  
AGGTTACAACGTRGAATTTATTCTCGCTCCGGAAACCGGAGATCATGAGAATTATTCATTTCTATTTTGAT  
AATACATCTTCTGCCGCCAAAAGAGATGTTAAATGAGATGGAGGGAAGTTTTTTCAGAACTTGCAGGAAAGCCT  
TTGAAAATGAAAACCTGGATCTAAGCGATGACGCTCCGATCATCAAAATGGTCAACGTGATCCTTTCCCA  
AGCGGTCAACGAAAGGGCTTCGGATATTCACATTGAACCTTACGAAAAGTCTCTCGTGGTTTCGCTATCGT  
GTGGATGGTATTTTGCATAACGTGCTTAGTCTCCTAAATCGTATCACGCGGGTATTTCTTCCAGAATCA  
AGATCATGTCTAATTTGAACATCGCTGAAAATAGACTTCTCCTCAAGACGGAAGGATCAAACCTATTTGGC  
TGGTAAGGATATAGATATCCGGGTTTCCACCATTCTTGTGAGTTCGGGAGAACGGATCGTAATGAGGCTT  
TTGAATAAAAACGGATCAAAAAGTATTTCTTTAGATACGATGGGTTTTTATCCAGAATTAATCCAGTCTTTGC  
GTTTCGTTAATTTACGAACCTCATGGAATCATTTTTAGTAACGGGACCGACCGGATCGGGTAAGTCTACTAC  
ATTATATTCTGCGTTAAGCGAACTCAATACAGAAGAAAGAAACATCATCACCTGCGAAGATCCTGTGGAA  
TATCAGATTGAAGGAATTTCTCAAATGCAAATGCAGGAAAAAATGGTCTTACGTTTGCAACTGGACTTC  
GAGCCATCCTTCGACAAGACCCGGACGTTATCATGGTAGGTGAGATTCGAGATGAAGAAACCGCAAGAAT  
CGCGATCCAAGCTTCTCTGACCGGTCACCTGTTTTTTCTACGTTTACACAAAACGATGCAGCAAGTGCC  
GCGACTCGTTTGATCGATATGGGAATCGAGCCCTATCTGATTACTTCCACAGTATTAGGATTTATGGCTC  
AAAGACTTGTAAGAGTTATCTGCACTCAATGTAAAGAAACGTATAAACCTACCCTTCGGAACCTAGAGTC  
CATTGGCATCTCTAAAAAATTTTTAAAGAACGGTAACTTACATCGTGGTAAAGGTTGTTCTCATTGTATG  
GGAACCTGGTTTTAAAGGTAGAATCGGAATTTATGAACTTTTTACTTGTAAATTTCTCCTCTCAAACAAGCAA  
TTCTTTCATGGTAAAAGACGCTGGACAGTTAAACGAAATCGCYCTCGAACATGAGTTTCAAACCTCTAAAAGA  
TTATGGAATTAGAAAAGGTAATCGATGGTGTAACTACAATCGACGAAGTTCTCAGGGTAACTTAA

LKTLGDILIEEGIISEKDLDSLKVQKKNLPLSHIIQKKGIAGEADILRALSKLYQLEFREKL  
EFTGMEEIFLQIPLKLIQKSRIVPFSLSKKTIRIAVSDPSDLHPMDDARNFLKGYNVEFILAPE  
PEIMRIIHSFNDTSSAAKEMLNEMEGSFSELAFAFENETLDSLDDAPIIKMVNVIILSQAVNER  
ASDIHIEPYEKSLVVRVYRVDGILHNVLSPPKSYHAGISSRIKIMSNLNIAENRPLQDGRIKLRL  
AGKDIDIRVSTIPCQFGERIVMRLLNKTDQKYSLDTMGFYPELIQSLRSLIYEPHGIILVTGPT  
GSGKSTTLYSALSELNTEERNIITCEDPVEYQIEGISQMOMEKIGLTFATGLRAILRQDPDVI  
MVGEIRDEETARIAIQASLTGHLVSTLHTNDAASAATRLIDMGIEPYLITSTVLGMAQRLVR  
VICTQCKETYKPTTSELESIGISKKFLKNGNLHRGKGC SHCMGTGFKGRIGIYELLVNSPLKQ  
AILHGKDAGQLNEIALEHEFQTLKDYGIRKVIDGVTTIDEVLRVT

***gspF***

**LOCaS 46**

ATGGCGATTTATTCTTACGTTGCATTTAATAAGAAGGGTAAAGAAGAAAAAGGAATTATAGACGCGGCTT  
CTCTTCAAGCTGCAAGATCTAAATTAAAAAACAAAGGTCTTTATGTTTCGTAGTATTTCCGAAGATCCGA  
AAGAAAGGATCGGGAACCTATTTCTTTTTTAGCAAAATATCTTTATCGAATCCCACGTAAAGAAGTAGGT  
CTTTTTTCAAGACAACCTGGCCACGTTACTTGGGGCAGGGATCCACTTGATAAATCTTTATCGAGTATCG  
TAGAACAAACTGAAAATCAGAAATTCAGAAAAGTAATTACCGGAATGCAAGCAAACATTACGGAAGGTTT  
TTCTTGTCCGAAGCGATGAAAAACATCCAGATGTGTTTCCGAGTCAGTTTCCGTCTCTCGTCCGGTT  
GGTGAAAAACAGGAGATTATGAAGCTACTCTCACGCGACTTGCAGGAACTAGAAGAAAAATCCAGCGAAC  
TAAAAGCGAAAGTACAAGTGCAATGGTGTATCCATTTATTATGGGTTTCCTTATCTATTTTTGTGACGAT  
TTTTTTATTAACCGTAGTTATCCCTCAGATTCAGGAACGTTTTTTACAATTCGATGCAAAACCTCCTCTG  
ATTACCAGAATTGTAATCGGAGTTTCTGACTTTCTCATTTGGGTTTTGGTGGTTAATTTCTTACTTTGGGTT  
TTGGGGGAATTGTAGGTTTTATCTATTATAAAAAACTCCTAAAGGAAAACGAAACTGGGACGAGTTTCGT  
TTTGAAAATTCCAATATTAGGATCTCTTGCAGTAAGGTTTTAGTTAGTAGTTTTGCAAGAAACATCGGA  
ATTCTTTTGTAGCAACCGAGTTCTCTGATTACTCTTGTGATCGTAGAAAAGATAGTAGATCATTTCTA  
TCTTTGGTGAGGAAATTA AAAACGCGGTGAAAAAATCAAAGAAGGGGAAAAACTTCTTCTTCTTTGG

TGGATCGGTGATTTTACCTCAGATGGTTTTAGGTATGATTTCCGCCGGAGAGGTTTCGGATCGAGTCCG  
GAAATGATGAATAAACTCGCGGATATTTACGATTCGGAAGTGGATACCGCAATCAAACAATGACTCAAT  
CGATGGAACCTCTAATGATTGTGGTTATGGGTCTTTTGATTGGAACGATTATGGCTTCGATCATGGTCCC  
AATGTACAACCTTGACGCAACAACCTTCAAAATATATAG

MAIYSYVAFNKKGKEEKGIIDAASLQAARSKLKNKGLYVRSISEDSEKRDRELFPPFLAKYLYRI  
PRKEVGLFSRQLATLLGAGIPLDKSLSSIVEQTENQNFVKVITGMQANITEGSSLSSEAMKKHPD  
VFPSQFPSLVAVGEKTDYEAATLRLAELEEKSSSELKAKVQVAMVYVPIFIMGSLSIFVTIFLLTV  
VIPQIQELFLQFDAKLPLITRIVIGVSDFLIGFWWLILTLGFGGIVGFIYKNTPKGKRNWDEF  
VLKIPILGSLARKVLVSSFARNIGILLSNRVPLITTLVIVEKIVDHSIFGEEIKNAVEKIKEGE  
KLSSSFGGSVILPQMVLMISAGEVSDRVPEMMNKLADIYDSEVDTAIKTMTQSMELMIVVMG  
LLIGTIMASIMVPMYNLTQQLQNI

### Hond Utrecht IV

ATGGCGATTTATTCTTACGTTGCATTTAATAAGAAGGGTAAAGAAGAAAAGGAATTATAGACGGGCTT  
CTCTTCAAGCTGCAAGATCTAAATTAACAAAACAAAGGTCTTTATGTTCGTAGTATTTCCGAAGATCCGA  
AAGAAAGGATCGGGAACCTATTTCTTTTCTAGCAAAATATCTTTATCGAATCCCACGTAAAGAAGTAGGT  
CTTTTTTCAAGACAACCTGGCCACGTTACTTGGGGCAGGGATCCACTTGATAAATCTTTATCGAGTATCG  
TAGAACAACTGAAATCAGAAATTCAGAAAAGTAATTACCGGAATGCAAGCAAACATTACGGAAGGTTT  
TTCCTTGTCCGAAGCGATGAAAAACATCCAGATGTGTTTCCGAGTCAGTTTCCGTCTCTCGTCGCGGTT  
GGTGAAAAACAGGAGATATGAAGCTACTCTCACGCGACTTGCAGAACCTAGAAGAAAAATCCAGCGAAC  
TAAAGCGAAAGTACAAGTGGCAATGGTGTATCCATTTATTATGGGTTCCCTTATCTATTTTTGTGACGAT  
TTTTTTATTAACCGTAGTTATCCCTCAGATTCAGGAACCTGTTTTTACAATTCGATGCAAAACTTCCCTCTG  
ATTACCAGAATTGTAATCGGAGTTTCTGACTTTCTCATTTGGGTTTTGGTGGTTAATCTTACTTTGGGTT  
TTGGGGGAATTGTAGGTTTTATCTATTATAAAAAACTCCTAAAGGAAAACGAAACTGGGACGAGTTCGT  
TTTGAAAAATCCAATATTAGGATCTCTTGC CGTAAGGTTTTAGTTAGTAGTTTTGCAAGAAACATCGGA  
ATTCTTTTGAGCAACCGAGTTCCTCTGATTACTACTCTTGTTCATCGTAGAAAAGATAGTAGATCATTCTA  
TCTTTGGTGAGGAAATTAACAAACGCGGTGGAAAAATCAAAGAAGGGGAAAAACTTCTTCTCTCTTTGG  
TGGATCGGTGATTTTACCTCAGATGGTTTTAGGTATGATTTCCGCCGGAGAGGTTTCGGATCGAGTCCG  
GAAATGATGAATAAACTCGCGGATATTTACGATTCGGAAGTGGATACCGCAATCAAACAATGACTCAAT  
CGATGGAACCTCTAATGATTGTGGTTATGGGTCTTTTGATTGGAACGATTATGGCTTCGATCATGGTCCC  
AATGTACAACCTTGACGCAACAACCTTCAAAATATATAG

MAIYSYVAFNKKGKEEKGIIDAASLQAARSKLKNKGLYVRSISEDSEKRDRELFPPFLAKYLYRI  
PRKEVGLFSRQLATLLGAGIPLDKSLSSIVEQTENQNFVKVITGMQANITEGSSLSSEAMKKHPD  
VFPSQFPSLVAVGEKTDYEAATLRLAELEEKSSSELKAKVQVAMVYVPIFIMGSLSIFVTIFLLTV  
VIPQIQELFLQFDAKLPLITRIVIGVSDFLIGFWWLILTLGFGGIVGFIYKNTPKGKRNWDEF  
VLKIPILGSLARKVLVSSFARNIGILLSNRVPLITTLVIVEKIVDHSIFGEEIKNAVEKIKEGE  
KLSSSFGGSVILPQMVLMISAGEVSDRVPEMMNKLADIYDSEVDTAIKTMTQSMELMIVVMG  
LLIGTIMASIMVPMYNLTQQLQNI

### *gspG*

### LOCaS 46

TTGAATCTGTCCAAATTA AAAAGAAAATATAGAAARGGTCTAACGCTGATCGAACTYGCAGTCGTAGTGA  
TTWCCTAGGCGCTCTGATCGCMCTCGTTTATTTCAATTTTCGYCCAGGTGAAATCAGCGATGATACGGC  
TGCACCTAAACTAAAAAAGACGCKTACGAACCTCAGTCTCATCTAGAAAGATATGCACAACGTTATGGG  
ACGTATCCTTCTGATGAACAGGGACTGGAAGCTCTGGTTGAAAAGCCACCACGGGAGACGTTCCTGAAA  
GATTGGAAACCTATCCTAACTAAAAAAGCCGCAATCAACGATCCTTGGGGAACCTACCTATAAACTTAAGA  
GAGACGTAAACGGAGAAAATCAAAATCGTAACTATGGGTAAGGATAAAAAAGACGGCGGAGAGGGTAAAAA  
TGCTGACTTTAACATTTCTCAACGAAGACGAATATCCTTCCGATTTCCGTAGAAAATA

LNLSKLKRKYRKGLTLIELAVVIXL GALIALVYSNFRPGEISDDTAALKLKKDAYELQSHLERYAQRYG  
TYPSEQGLEALVEKPTTGDVPERLETPN\*KSRNQRSIGNYL\*T\*ERRKRRNSNRNYG\*G\*KRRRRG\*K  
C\*L\*HSQRRRISFRFP\*KI

### Hond Utrecht IV

TTGAATCTGTCCAAATTA AAAAGAAAATATAGAAARGGTCTAACGCTGATCGAACTYGCAGTCGTAGTGA  
TTATCCTAGGCGCTCTGATCGCACTCGTTTATTTCAATTTTCGYCCAGGTGAAATCAGCGATGATACGGC

TGCACTCAAACCTAAAAAAGACGCKTACGAACTTCAGTCTCATCTAGAAAAGATATGCACAACGTTATGGG  
ACGTATCCTTCTGATGAACAGGGACTGGAAGCTCTGGTTGAAAAGCCCACCACGGGAGACGTTCCTGAAA  
GATTGGAAACCTATCCTAACTAAAAAAGCCGCAATCAACGATCCTTGGGGAACTACCTATAAACTTAAGA  
GAGACGTAAACGGAGAAAATTCAAAATCGTAACTATGGGTAAGGATAAAAAAGACGGCGGAGAGGGTAAAAA  
TGCTGACTTTAACATTTCTCAACGAAGACGAATATCCTTCCGATTTCCGTAGAAAATA

LNLKLRKRYRGLTLELAVVVIILGALIALVYSNFRPGEISDDTAALKLKKDAYELQSHLERYAQRYS  
TYPSEQGLEALVEKPTTGDVPERLETPN\***K**SRNQRSISLGNL\***T**\*ERRKRRNSNRNYG\***G**\*KRRRRG\***K**  
C\***L**\*HSQRRRISFRFP\***K**I

## ***gspH***

### **LOCaS 46**

ATGAAGGTTAAAAATATCCGGAAAGGATTTACCCTGATCGAGTTGATCGTGGTTATCGCGATCCTCGCGG  
GGTAAATTAGTATTCTTGCAAGTACCGCTGCAAACTTTATCATTCCTTCGGGAAGTGACGCGGCACAAAC  
TTTAAAAACAAGCCGCTGAATTTCTGTTATCGAAAAATCCATTTACAAACACCACCTATGGTTTTAGARCTG  
GATATAGACAACGATACCTATTCTATCAAAAAATTTACTTCGAGACGAAAGTGAATTAAGAAGTTTTGG  
TTTTTAAACCTCAGAAACTTCCCTTATACTTCCGAAATTATAGATATAACWGATATTAGAGGTTTTAGATA  
TACGAAAGGAATTATTAAGTTCCCTATACCTATCTTGGGATCTCGGCAGACTAYAGYGTACATTTGGGA  
AGTGATCCTTCCATTTATAGAACTTTGATTCTTTATAGATACGGCGGAAAGGTTTTCCGTTGTGGAAGGAG  
AGCAGTTTTCATACTTCTTCGAATTTGGCAACCGATAAAAAATTGGAAAGAACAGGATGATAACGAACAACA  
ACAGCCCTAA

**M**KVKNIRKGF<sup>1</sup>TLIELIVVIAILAGLISILASTAANFIIIPSGSDAAQTLKQAAEF<sup>2</sup>CYR<sup>3</sup>KSI  
LTNT<sup>4</sup>TMVLELDIDNDTYSIKKLLRDESGI<sup>5</sup>KEVLVFKPQKLPYTSEIIDITDIRGFRYTKG  
IIKVPYTYLGISADYSVHLGSDPSIYRTLILYRYGGKVSVEGEQFHTSSNLATDKNWKE  
QDDNEQQQP

### **Hond Utrecht IV**

ATGAAGGTTAAAAATATCCGGAAAGGATTTACCCTGATCGAGTTGATCGTGGTTATCGCGATCCTCGCGG  
GGTAAATTAGTATTCTTGCAAGTACCGCTGCAAACTTTATCATTCCTTCGGGAAGTGACGCGGCACAAAC  
TTTAAAAACAAGCCGCTGAATTTCTGTTATCGAAAAATCCATTTACAAACACCACCTATGGTTTTAGARCTG  
GATATAGACAACGATACCTATTCTATCAAAAAATTTACTTCGAGACGAAAGTGAATTAAGAAGTTTTGG  
TTTTTAAACCTCAGAAACTTCCCTTATACTTCCGAAATTATAGATATAACAGATATTAGAGGTTTTAGATA  
TACGAAAGGAATTATTAAGTTCCCTATACCTATCTTGGGATCTCGGCAGACTATAGCGTACATTTGGGA  
AGTGATCCTTCCATTTATAGAACTTTGATTCTTTATAGATACGGCGGAAAGGTTTTCCGTTGTGGAAGGAG  
AGCAGTTTTCATACTTCTTCGAATTTGGCAACCGATAAAAAATTGGAAAGAACAGGATGATAACGAACAACA  
ACAGCCCTAA

**M**KVKNIRKGF<sup>1</sup>TLIELIVVIAILAGLISILASTAANFIIIPSGSDAAQTLKQAAEF<sup>2</sup>CYR<sup>3</sup>KSI  
LTNT<sup>4</sup>TMVLELDIDNDTYSIKKLLRDESGI<sup>5</sup>KEVLVFKPQKLPYTSEIIDITDIRGFRYTKGI  
IIKVPYTYLGISADYSVHLGSDPSIYRTLILYRYGGKVSVEGEQFHTSSNLATDKNWKE  
QDDNEQQQP

## ***gspl***

### **LOCaS 46**

ATGATAACGAACAACAACAGCCCTAAGATTCTTGTCTTCTAAATTTTCAGTTCGAAGAGGTTTTAATTTAA  
TCGAGGTTTCCATCGCTCTTGCGTTAGCCGGAATTGCTATGACATATACTTACATGGTGATTTCAAACGG  
GATCAAACAACAGAGAATGGCTACTGTGATCTCAAACGCGGTTCAATTTAGCTAAAATTTAAATGGCTCAG  
ATCGATTCCGTATCCGTA<sup>1</sup>CTCAGTCTGATAAACTTCGGGAGATATTCGGGTTATCCAGGTTACGGCT  
TTGAAACCTCGATTAATGAGGAAGACATGGATCTTTTGAAACTTTCTGGAAAGGACAGTCAAAGCCGGA  
AGATTTACTCGGAGGTAGAGATTCCGAGATGAATAAATTTGATCATGAGAAGATCTGGTCAAGCTAGTCAA  
GGAGCTGCCACGGCGGGGATTATCCGAGTTTTTAGAATYAAAGTTACGATCAAATATCCCCTGGAAGTG  
GAACCGAATCTTACACAGCGGAGACGTTTAAAGTCCGCACAATATTTAA

**M**ITNNNSPKILVSKFSVRRGFN<sup>1</sup>LIEVSI<sup>2</sup>ALALAGIAMTYTYM<sup>3</sup>VISNGIKQQR<sup>4</sup>MATVISNAVH<sup>5</sup>LA  
KIKMAQIDSVSVLQSDKTS<sup>6</sup>GDIPGYPGYGFETSINEEDMDLLKLSGKDSQKPEDLLGGRDSEM<sup>7</sup>N  
KLIMRRSQASQGAATAGIIRVFRIKVTIKYPTGSGTESYTAETFKSAQY

**Hond Utrecht IV**

ATGATAACGAACAACAACAGCCCTAAGATTCTTGTCTTCTAAATTTTCAGTTCGAAGAGGTTTTAATTTAA  
TCGAGGTTTTCCATCGCTCTTGGCTTAGCCGGAATTGCTATGACATATACTTACATGGTGATTTCAAACGG  
GATCAAACAACAGAGAATGGCTACTGTGATCTCAAACGCGGTTTCAATTTAGCTAAAATTTAAATGGCTCAG  
ATCGATTCCGTATCCGTACTTCAGTCTGATAAACTWCGGGAGATATTCGGGTTATCCAGGTTACGGCT  
TTGAAACCTCGATYAATGAGGAAGAYATGGATCTTTTGAACTTTCTGGAAAGGACAGTCAAAGCCGGA  
AGATTTACTCGGAGGTAGAGATTCGGAGATGAATAAATTGATCATGAGAAGATCTGGTCAAGCTAGTCAA  
GGAGCTGCCACGGCGGGGATTATCCGAGTTTTTGAATYAAAGTTACGATCAAATATCCCCTGGAAGTG  
GAACCGAATCTTACACAGCGGAGACGTTTAAAGTCCGCACAATATTAA

MITNNSPKILVSKFSVRRGFNLIIEVSI LALAGIAMTYTYMVISNGIKQQRMATVISNAVHLA  
KIKMAQIDSVSVLQSDKTXGDI PGYPGYGFETSINEEDMDLLKLSGKDSQKPEDLLGGRDSEMN  
KLIMRRSQASQGAATAGI IRVFRIKVTIKYPTGSGTESYTAETFKSAQY

***gspJ***

**LOCaS 46**

ATGAACTTAAGAGACGTCAAATTTAAGCGAAACGGTTTTACATTGATCGAAATCTCGATCGTTGTGATGA  
TTTTAGGCGTTATCTTTACTGGAATTTTTTCCACCTATTATACTGCTCTTAGAATTTCCAGAGAATCTTC  
TTCTCCCGGAGGTGCAGCAAAAARGATATTTACTCGCAATGGAAAATGTACGAAGTACGATTTCTATG  
ACGTATTTTCATCAAAATCAAAGAAGATTAATTTTTATCGGTAAAAGTGAAGGTAGAGGTGCGGTCCGTA  
AGGATCGATTGGATTTTGC GGCTACTCATCTA ACTCTGAGGAAGTTTCCTTACCGGAGGTGCGTGAAGT  
TTCTTTTACTTAAAACCTATGCCGGACGATTCAAATTACAATTTTTTAATACGYAGAGAGGACGAGATG  
GTGGATCGTTATCCTAAATCGGGAGGAACGGAATACACCTTGTGACTCACGTAAAAGTTTTTCAACTTA  
AGTATTCTAGAACC GGAACGAAATGGGAAGACGAGTGGGATTCTAAACTCGCTAAAGCAATTCCTAGGTT  
GATTCGAATTGAGTTGATCGTAAATCTG GGA AAAAGGAGGTCCGTTATGAAACTCTTGC GTTTCTGGA  
ATTCTTTTTAAGTAA

MNLRDVKFKRNGFTLIEISIVVMILGVI FTGIFSTYYTALRISRESSSPGGAAKRDILLAMENV  
RSTISM TYFHQNRRLIFIGKSEGRGAVRKDRLDFAATHPNSEEVSLPEVREVSFYLPMPDDS  
NYNFLIRREDEMVD RY PKSGGTEY TLLTHVKS FQLKYSRTG TKWEDEWDSKLAKAI PRLIRIEL  
IVNSGKKEVRYETLAFPGILFK

**Hond Utrecht IV**

ATGAACTTAAGAGACGTCAAATTTAAGCGAAACGGTTTTACATTGATCGAAATCTCGATCGTTGTGATGA  
TTTTAGGCGTTATCTTTACTGGAATTTTTTCCACCTATTATACTGCTCTTAGAATTTCCAGAGAATCTTC  
TTCTCCCGGAGGTGCAGCAAAAARGATATTTACTCGCAATGGAAAATGTACGAAGTACGATTTCTATG  
ACGTATTTTCATCAAAATCAAAGAAGATTAATTTTTATCGGTAAAAGTGAAGGTAGAGGTGCGGTCCGTA  
AGGATCGATTGGATTTTGC GGCTACTCATCTA ACTCTGAGGAAGTTTCCTTACCGGAGGTGCGTGAAGT  
TTCTTTTACTTAAAACCTATGCCGGACGATTCAAATTACAATTTTTTAATACGYAGAGAGGACGAGATG  
GTGGATCGTTATCCTAAATCGGGAGGAACGGAATACACCTTGTGACTCACGTAAAAGTTTTTCAACTTA  
AGTATTCTAGAACC GGAACGAAATGGGAAGACGAGTGGGATTCTAAACTCGCTAAAGCAATTCCTAGGTT  
GATTCGAATTGAGTTGATCGTAAATCTG GGA AAAAGGAGGTCCGTTATGAAACTCTTGC GTTTCTGGA  
ATTCTTTTTAAGTAA

MNLRDVKFKRNGFTLIEISIVVMILGVI FTGIFSTYYTALRISRESSSPGGAAKRDILLAMENV  
RSTISM TYFHQNRRLIFIGKSEGRGAVRKDRLDFAATHPNSEEVSLPEVREVSFYLPMPDDS  
NYNFLIRREDEMVD RY PKSGGTEY TLLTHVKS FQLKYSRTG TKWEDEWDSKLAKAI PRLIRIEL  
IVNSGKKEVRYETLAFPGILFK

***gspK***

**LOCaS 46**

TTGTATGAGTTTACACAGTTTCAGTTTTTTCGCACAAATCTCCATTGGGTACGGAACAATCCACTTACA  
AAACAAAAAGAATTTCTGGCGAGCTCTATCTTCTTATAGACTTAGAAAATCTAGAAAAGGTTTTATGGT  
CGTAATTTTAGTAATGGCGATTGGGACCGCATCGTTTTATACCGCTACTGAATTCGGAGAACGTTCCCTTA  
GGTGAAAGAAGAATTGCACAAGCGGATGCAGATGGATTTAGAGCGCTCTTACTGGCCAAGGCAGGTTTTTC  
AAGGTGCTTTGGGTGCGTTAAAAAAAATACCAGAAGAATATCTTTACAAAAGTGGGATTGCACTTAATCC  
TCCACCTTTGCCGTTGGGAGGTGGAACGATTTATTATAAGATCAGTTCGGAAGACGGAAGATTAATTTA

AATTCTCTTTTGAACCAAGATGATAATCAGCAAAATCTTCGTTCTGTCGAGATGCTTTCCAGACTTTTTG  
ATCACTTCGGTATCAAACGAGAAAAGATTTTTCCGATTTTTGATTGGATGGATACGGACCTTCAAGAAAT  
GGGAGGAGGTGCAGAAGATGCATATTTATCTTCTTTAAAACCTCCTAGGAAAAATAAGAATTTCTTTTATG  
TATTCTATTTTCGGAACCTGGTTTCCGTAAAGGGGTTTGATAGAGCTACAGTTTACGGCTCTTTAAAACCGG  
CGGATTTTTGATCAAAAAATATCCAAAAGCGTTTCAATCGGAAGAAGAAAAGGCATTGATCGGAGACAGTGA  
TTTTGTATTGGCAAATAACGTAACCGCATACATTCCTTCGGGGCAAACCTCGGATGATAGAATCAACTTG  
AACGGTGCACCATATTTTGTGTTTATGATGCTTTATCCGATTTTATGACTAAACAGGCCGCCATGAGAATTC  
TAAAATTCAAATTTGGAGCAGGGCGGTTTATCAAAGAAGCTGAAGGATCTGGAAAAATTCAGGAATTTCA  
AATTCTACGTCAGGTGGGTTGACTCTTTATAAAGAGCTTGCGGGGGAAGGAACCGAAGTTTCCGGAGGA  
AGAGTCAARACCAAAGGAGAAAATTTTTAGAATCGTAGCGGTTGGTCAAGTAGGGAAAACGATTCGAAGGA  
TTACTGGGATTTTTGATCTGACTAACAATCAAATGCTCTATTATATGGAAGATTAA

LYEFTQFQFFAQILHWVRNNSYKTKKNSWRALSSYRLRKSARKGFMVVLVMAIGTASFYTATE  
FGERSLGERRIAQADADGFRALLLAKAGFQALGALKKIPEEYLYKSGIALNPPPLPLGGGTIY  
YKISSEDKINLNSLLNQDDNQNLRSVEMLSRFLDHFHGIKREKIFPIFDWMDTDLQEMGGGAE  
DAYYSSLKPPRKNKNSFMYSISELVSVKGFDRATVYGLKPADFDQKYSKAFQSEEEKALIGDS  
DFVLANNVTAYIPSGQNSDDRINLNGAPYFVLM SLSDFMTKQAAMRILKFKLEQGGFIKELKDL  
EKFQEFQIPTSGGLTLYKELAGEGTEVSGGRVKTKEIFRIVAVGQVGTIRRITGIFDLTNNQ  
MLYYMED

### Hond Utrecht IV

TTGTATGAGTTTACACAGTTTCAGTTTTTCGCACAAATCTCTYATTGGGTACGGAACAATTCCTACTTACA  
AAACAAAAAGAATTTCTTGCGGAGCTCTATCTTCTTATAGACTTAGAAAACTAGAAAAGGTTTTATGGT  
CGTAATTTTAGTAATGGCGATTGGGACCGCATCGTTTTTATACCGCTACTGAATTCGGAGAACGTTCCCTTA  
GGTGAAAGAAGAATTGCACAAGCGGATGCAGATGGATTTAGAGCGCTCTTACTGGCCAAGGCAGGTTTTTC  
AAGGTGCTTTGGGTGCGTTAAAAAAAATACCAGAAGAATATCTTTACAAAAGTGGGATTGCACTTAATCC  
TCCACCTTTGCCGTTGGGAGGTGGAACGATTTATTATAAGATCAGTTCGGAAGACGGAAAGATTAATTTA  
AATTCTCTTTTGAACCAAGATGATAATCAGCAAAATCTTCGTTCTGTCGAGATGCTTTCCAGACTTTTTG  
ATCACTTCGGTATCAAACGAGAAAAGATTTTTCCGATTTTTGATTGGATGGATACGGACCTTCAAGAAAT  
GGGAGGAGGTGCAGAAGATGCATATTTATCTTCTTTAAAACCTCCTAGGAAAAATAAGAATTTCTTTTATG  
TATTCTATTTTCGGAACCTGGTTTCCGTAAAGGGGTTTGATAGAGCTACAGTTTACGGCTCTTTAAAACCGG  
CGGATTTTTGATCAAAAAATATCCAAAAGCGTTTCAATCGGAAGAAGAAAAGGCATTGATCGGAGACAGTGA  
TTTTGTATTGGCAAATAACGTAACCGCATACATTCCTTCGGGGCAAACCTCGGATGATAGAATCAACTTG  
AACGGTGCACCATATTTTGTGTTTATGATGCTTTATCCGATTTTATGACTAAACAGGCCGCCATGAGAATTC  
TAAAATTCAAATTTGGAGCAGGGCGGTTTATCAAAGAAGCTGAAGGATCTGGAAAAATTCAGGAATTTCA  
AATTCTACGTCAGGTGGGTTGACTCTTTATAAAGAGCTTGCGGGGGAAGGAACCGAAGTTTCCGGAGGA  
AGAGTCAARACCAAAGGAGAAAATTTTTAGAATCGTAGCGGTTGGTCAAGTAGGGAAAACGATTCGAAGGA  
TTACTGGGATTTTTGATCTGACTAACAATCAAATGCTCTATTATATGGAAGATTAA

LYEFTQFQFFAQILXWVRNNSYKTKKNSWRALSSYRLRKSARKGFMVVLVMAIGTASFYTATE  
FGERSLGERRIAQADADGFRALLLAKAGFQALGALKKIPEEYLYKSGIALNPPPLPLGGGTIY  
YKISSEDKINLNSLLNQDDNQNLRSVEMLSRFLDHFHGIKREKIFPIFDWMDTDLQEMGGGAE  
DAYYSSLKPPRKNKNSFMYSISELVSVKGFDRATVYGLKPADFDQKYSKAFQSEEEKALIGDS  
DFVLANNVTAYIPSGQNSDDRINLNGAPYFVLM SLSDFMTKQAAMRILKFKLEQGGFIKELKDL  
EKFQEFQIPTSGGLTLYKELAGEGTEVSGGRVKTKEIFRIVAVGQVGTIRRITGIFDLTNNQ  
MLYYMED

### gspL

#### LOCaS 46

ATGTTTATTTATGATCAATTTCTMGCAGTCGATTATGGAACGAATACAATCAAAGGTGTTCTCTTTCAA  
AAGTTCTAGGAAAGTTGACCATTCTTCGTTCTGAAATCATGAGTATTTCTCATGGAGAAGAAGAGGAGTA  
TAGGCATAATGTTCTTCGTTTTATCAATTCCTATTTTCCAGGCGAAACCAGTATTTCTTTAAATCTTCCT  
TTAGATCGTCTTTTTGTAAAGGGAACCTTCATATCCCTCTAACRACTGTAAAAGCGATTTCGAGAAGTAATCC  
CTTTCGAAGTAGAAAGTAGAATTCATTTCCCATGGAAACAGTGGAAGTAACGGGGAATATATGGAGAAT  
CGATCAGGAAAAATCRGACGTGATCGGTATTCTGCGCATCATAGCGAATTTGGATTTTATCACMGCACCT  
TTTTTAGACAGTAACATCGTRTTTAGAGTTTGTGTTGTAGATTTCGGTCAGTCTTTCTGTTTATTATCAC  
AACATTTCTAATAAAGAAAATCAAAGTAAGAAGTGCACATCAAGTAGATATAGGTGGAAGAGTTACAATCTT  
AAATATTTTGGAGGATGGAAAAGTTGCACATACAAGATAACATTTCTATGGGAGGGGACACTTAACGGAT

CAGATCGCTTCCGATCTCAAAATCCCTTTTGAAAAAGCAGAAGCAATTAAACTTTTCACTTCAATTTGAAC  
CTTTTTTCGGAAGAAGAAGACGATCTCAATTTATTCGCGAAAAGAAATTCAAACTCAAAGAGGCGGATATTAA  
AAAAGCATTTCAAAAGTGC GG GAAAATTTTTAGAAAACTTTCTTCTGAAATTCAAAGAAGTATTGTATCT  
ATGAATGAAACC GAAAGGCCAGAAGTTTTATATCTTTTCGGGTGGTGGTGGCAAATTCGTGGGATCGAAT  
CTTTTTTTAATGATTCTCTTGGTTTGATTACTCATAGATACGATTTTCTTTCTTTGAACGGGGATTCCCT  
TGCGACCTGTTTAGGAATGGGGTATCATTTTTGGTTTTCC TAAAAAAGATAAAGTAGATTTTATCGACACA  
CCTCACGTAAAACGGATTAATAAGAATATTCTAAACTTAGATCAATTTAGACATCATTTGATCTTTTCTG  
GAATTTCTTTATTCATTTTAACTACCGTTTTTTTTGTAGGAATCGTAGTAGATAAACGTAACCTTAACGC  
GAGTGATAAAATGCTCGCAGAAAAATTTCAAAAAGTTTTGGTAGACCTGCTCCCGAAGACGAAGATATA  
TTAGAATATGCTGCTAAACTTAAAAACGACGAGAAGAAAAAACAGAGATCTACAGACTTTACTTAAGTA  
AACCGAGTATTTTAGATATTTTATTTGAACTTTCCATGAATTTTCCATCTGCGGATATGCAGCCGTTTCA  
ACTGGATCAGTTTGACTACGATCAGGATTTGGTCAAGATAGGCGGAAGAGTGAACGAATTCAGTGAGATC  
GGTGTAGTACAAAAGATCTTTGGAAAAATCTACTATGTTCAAAGACATAGAGATTGTGGATAAAAAATTTGA  
TGCAGGGTGTCAAAAATATAAAGTTTCTTTTATCATTTAAAATGAAAGTCACCAATAAGCCAACCTCTGA  
GGAGCTTTTTTAA

MFIYDQFLAVDYGTNTIKGVLFQKVLGKLTILRSEIMSI SHGEEEEYRHNVLRFINSYFPGETS  
ILLNLPLDRLFVRELHIPLTTVKAIREVIPFEVESRI PFMETVEVTGNIWRIDQEKSDVIAYS  
AHHSELDFITAPFLDSNIVFRGLFVDSVLSVITQHSNKEIQSKNCTQVDIGGRVTILNLILSD  
GKVAHTRYISMGGDTLTDQIASDLKIPFEKAEAIKLSLQFEPFSEEEDDLNLFAKEFKLKEADI  
KKAFQSAGKFLEKLSSEIQRSIVSMNETERPEVLYLSGGGGKIRGIESFFNDSLGLITHRYDFL  
SLNGDSFATCLGMGYHFGFPKDKVDFIDTPHVKRINKNILNLQFRHHLIFSGISLFI LTTVF  
FVGIVVDRKRLNASDKMLAEKFQKGFGRPAPEDEDILEYAAKLNDEKKKTEIYRLYLSKPSIL  
DILFELSMNFPSADMQPFQDQFDYDQDLVKIGGRVNEFSEIGVVQRSLEKSTMFKDIEIVDKK  
LMQGVKNYKVSFIKMKVTKPTSEESF

### Hond Utrecht IV

ATGTTTATTTATGATCAATTTCTMGCAGTCGATTATGGAACGAATACAATCAAAGGTGTTCTCTTTCAA  
AAGTTCTAGGAAAAGTTGACCATTCTTCGTTCTGAAATCATGAGTATTTCTCATGGAGAAGAAGAGGAGTA  
TAGGCATAATGTTCTTCGTTTTATCAATTCCTATTTTCCAGGCGAAACCAGTATTTCTTTTAAATCTTCCT  
TTAGATCGTCTTTTTGTAAAGGAACTTCATATCCCTCTAACRACGTAAAAGCGATTCGAGAAGTAATCC  
CTTTCGAAGTAGAAAAGTAGAATTCATTTCCCATGGAACAGTGAAGTAACGGGGAATATATGGAGAAT  
CGATCAGGAAAAATCRGACGTGATCGCGTATTCTGCGCATCATAGCGAATTGGATTTTATCACMGCACCT  
TTTTTAGACAGTAACATCGTRTTTAGAGTTTTGTTTGTAGATTCGGTCAGTCTTTCTTCTGTTATTACAC  
AACATTCTAATAAAGAAATTCAAAAGTAAGAATGCACTCAAGTAGATATAGGTGGAAGAGTTACAATCTT  
AAATATTTTGAGCGATGGAAAAGTTGCACATACAAGATACATTTCTATGGGAGGGGACACTCTAACGGAT  
CAGATCGCTTCCGATCTCAAAATCCCTTTTGAAAAAGCAGAAGCAATTAAACTTTTCACTTCAATTTGAAC  
CTTTTTTCGGAAGAAGAAGACGATCTCAATTTATTCGCGAAAAGAAATTCAAACTCAAAGAGGCGGATATTAA  
AAAAGCATTTCAAAAGTGC GG GAAAATTTTTAGAAAACTTTCTTCTGAAATTCAAAGAAGTATTGTATCT  
ATGAATGAAACC GAAAGGCCAGAAGTTTTATATCTTTTCGGGTGGTGGTGGCAAATTCGTGGGATCGAAT  
CTTTTTTTAATGATTCTCTTGGTTTGATTACTCATAGATACGATTTTCTTTCTTTTGAACGGGGATTCCCT  
TGCGACCTGTTTAGAATGGGGTATCATTTTTGGTTTTCC TAAAAAAGATAAAGTAGATTTTATTCGACACA  
CCTCACGTAAAACGGATTAATAAGAATATTCTAAACTTAGATCAATTTAGACATCATTTGATYTTTTCTG  
GAATTTCTTTATTCATTTTAACTACCGTTTTTTTTGTAGGAATCGTAGTAGATAAACGTAACCTTARCGC  
GAGTGATAAAATGCTCGCAGAAAAATTTCAAAAAGTTTTGGTAGACCTGCTCCCGAAGACGAAGATATA  
TTAGAATATGCTGCTAAACTTAAAAACGACGAGAAGAAAAAACAGAGATCTACAGACTTTACTTAAGTA  
AACCGAGTATTTTAGATATTTTATTTGAACTTTCCATGAATTTTCCATCTGCGGATATGCAGCCGTTTCA  
ACTGGATCAGTTTGACTACGATCAGGATTTGGTCAAGATAGGCGGAAGAGTGAACGAATTYAGTGAGATC  
GGTGTAGTACAAAAGATCTTTGGAAAAATCTACTATGTTCAAAGACATAGAGATTGTGGATAAAAAATTTGA  
TGCAGGGTGTCAAAAATATAAAGTTTCTTTTATCATTTAAAATGAAAGTCACCAATAAGCCAACCTCTGA  
GGAGCTTTTTTAA

MFIYDQFLAVDYGTNTIKGVLFQKVLGKLTILRSEIMSI SHGEEEEYRHNVLRFINSYFPGETS  
ILLNLPLDRLFVRELHIPLTTVKAIREVIPFEVESRI PFMETVEVTGNIWRIDQEKSDVIAYS  
AHHSELDFITAPFLDSNIVFRGLFVDSVLSVITQHSNKEIQSKNCTQVDIGGRVTILNLILSD  
GKVAHTRYISMGGDTLTDQIASDLKIPFEKAEAIKLSLQFEPFSEEEDDLNLFAKEFKLKEADI  
KKAFQSAGKFLEKLSSEIQRSIVSMNETERPEVLYLSGGGGKIRGIESFFNDSLGLITHRYDFL  
SLNGDSFATCLGMGYHFGFPKDKVDFIDTPHVKRINKNILNLQFRHHLIFSGISLFI LTTVF  
FVGIVVDRKRLXASDKMLAEKFQKGFGRPAPEDEDILEYAAKLNDEKKKTEIYRLYLSKPSIL

DILFELSMNFPADMQPFQLDQFDYDQDLVKIGGRVNEFSEIGVVQRSLEKSTMFKDIEIVDKK  
LMQGVKNYKVSFIKMKVTKPTSEESF

### ***gspM***

#### **LOCaS 46**

ATGTTTGATAAATTAGAGCCAAGAGAAAAGACTGATCGTATTGGGAGGAATCGGGTTGATTCTTTTGCCTGG  
TCGTGTTTTTGGCGATCAGGAAAGTGGTACTCTTCGTCAAGGGCTGACTGAAAAAGTACAGGATTCCAG  
AACTGCACCCGTAATAACTCGACAAGATTATTCAAGAATTCACGAATTTAGATCTTTAGATTCTTCCGGC  
GGGGAAACCGATGTAAGCGCCGTTTACGCAAAGTTAGACGAAATTTTCATAAGATATAGTCTGAAAGAGA  
AAATTTCCACAATGAAGGATTTTAACTCGATTGAAGATAAAAAATACAATCGGATCAGATCGATATTAA  
TTTTCGATCCGTAACCTTGGATAATATTTTTCGACTGATCTACGATATAGAAAAGAATAAGATGATTAAC  
GCCAGAGTGGAAATTTAAATTTTAAAAAACCATTTCAAGGTAAGGAAGTATATGATGTAATCTAAAAC  
TTTCTACCTACAGTCGAGTGGCGGGCGCAAAACGATGA

MFDKLEPRERLIVLGGIGLILLVFLAIRKVVTLRQGLTEKVQDSRTAPVKLDKIIQEFNEFR  
SLDSSGGETDVS AVYAKLDEIFIRYSLKEKISTMKDFNSIEDKKYNRITIDINFRSVTLDNIFR  
LIYDIEKNKMINARVEYLNFKKPFQGEVYDVNLKLSYSRVAGAKR

#### **Hond Utrecht IV**

ATGTTTGATAAATTAGAGCCAAGAGAAAAGACTGATCGTATTGGGAGGAATCGGGTTGATTCTTTTGCCTGG  
TCGTGTTTTTGGCGATCAGGAAAGTGGTACTCTTCGTCAAGGGCTGACTGAAAAAGTACAGGATTCCAG  
AACTGCACCCGTAATAACTCGACAAGATTATTCAAGAATTCACGAATTTAGATCTTTAGATTCTTCCGGC  
GGGGAAACCGATGTAAGCGCCGTTTACGCAAAGTTAGACGAAATTTTCATAAGATATAGTCTGAAAGAGA  
AAATTTCCACAATGAAGGATTTTAACTCGATTGAAGATAAAAAATACAATCGGATYACGATYATATTAA  
TTTTCGATCCGTAACCTTGGATAATATTTTTCGACTGATCTACGATATAGAAAAGAATAAGATGATTAAC  
GCCAGAGTGGAAATTTAAATTTTAAAAAACCATTTCAAGGTAAGGAAGTATATGATGTAATCTAAAAC  
TTTCTACCTACAGTCGAGTGGCGGGCGCAAAACGATGA

MFDKLEPRERLIVLGGIGLILLVFLAIRKVVTLRQGLTEKVQDSRTAPVKLDKIIQEFNEFR  
SLDSSGGETDVS AVYAKLDEIFIRYSLKEKISTMKDFNSIEDKKYNRITIDINFRSVTLDNIFR  
LIYDIEKNKMINARVEYLNFKKPFQGEVYDVNLKLSYSRVAGAKR

### ***gspN***

#### **LOCaS 46**

ATGAAAAAAGAAAAAGAGTTTCCGGAAGAACTGCGCTGACCCAGAAGAAGAAGAGTTTTTACTCTGG  
AGCTTCAGGAAGAGGAAGAAGCTGTTTCTCGTTTTTACGTTCAAACAAAAATTAATTCGATCGGAACCGG  
AATTTTTTTCGTTTCTCATTTTTTACGGTTTGGCTTTTTCTTTAGAYGAGATTGTACGTAGTTCTYTGTAT  
TCTTCATCCGTAAAAACGGGAACGATTATTAATTTTAGAGATCTGAGTATTTCCGTTTTGGGAAATGTAA  
CTTTAGATTCTCTCGAAGTYACAACCTTCTTCCAATCTCAAAATCAAAGCGGAAGAAGCGGTTCTAAAGAC  
TTCTTTGTTTGGTTTGAATAAGAAAAATTCGATGGGAAATTTAAATTTGGTTTCTTAAAAATCGATACC  
GAAAATGGACCTTTAGCAAAGATACGTAACCTTTGARGGYAAAGGAAAATTTGATAACTTAGACCAAGGTA  
TTTCTAGAATAAATGGTGCCTTGGATTGGAAATTCCTGCAGGGCCTTCTTCGGGAATGATTCAGGAGCT  
TCCGGAATTCACCTTTTAGGTGAACGAAAAATATAACGATTAATAAATTTCTTACAAAAGTGAATCTT  
CAAGGTGGAAATCTGATTTTCAACGATTTTACGTTAGATACATCGATTGCACGTTTTGATATTACTGGAA  
ATATTGATTTATCGGAAAAATATGTCTTTTTCTCAACTGAATCTTAGAATTTGTCTAGAACTCGATCGCAA  
CTTTGCTTTGGAAAAGACAAAGATATAGCGGATATGTTGACTCTTTTAGAAAAACAAAGTGGAAAGTAAATGT  
ATTCTGTGATGGGAACCTTTGGTAAACCGGATGTAATAAATTCAGGACTTACTGGRCCGCCTGCGCTGC  
CGGGAATCCGCCAGTTCTTGGAAAGTCCGTA

MKKEKEFPPEETALTPEEEEFLTLELQEEEEAVSRFTFKQKLILIGTGIFSLIFTVWLFPLDEI  
VRSSLYSSSVKTGTIINFRDLSISVLGNVTLDSLEVTTSSNLKIKAEAVLKTSFLGLIKKKFD  
GKFKLVSLKIDTENGPLAKIRNFEGKGFNDLQGISRINGALDLEIPAGPSSGMIQELPEIPL  
LGELKNITIKKFLTKVNLQGGNLI FNDFTLDTSIARFDITGNIRLSENMSFSQLNLRICLELDR  
NFALERQDIADMLTLLEKQSGSKCIPVMGTFGKPDVKIPGLTGPPALPGTPPVPGSP

#### **Hond Utrecht IV**

GAAAAAAGAAAAAGAGTTTCCGGAAGAACTGCGCTGACCCAGAAGAAGAAGAGTTTTTGGACTCTGGAG  
CTTCAGGAAGAGGAAGAAGCTGTTTCTCGTTTTACGTTCAAACAAAAATTAATTTCTGATCGGAACCGGAA  
TTTTTTTCGTTTTCTCATTTTTTACGGTTTGGCTTTTTCCTTTTAGAYGAGATTGTACGTAGTTCTYTGTATTC  
TTCATCCGTAAAAACGGGAACGATTATTAATTTTTAGAGATCTGAGTATTTCCGTTTTGGGAAATGTAAC  
TTAGATTCTCTCGAAGTYACAACCTCTTCCAATCTCAAAATCAAAGCGGAAGAAGCGGTTCTAAAGACTT  
CTTTGTTTGGTTTGATTAAGAAAAAATTCGATGGGAAATTTAAATTTGGTTTCTTAAAAATCGATACCGA  
AAATGGACCTTTAGCAAAGATACGTAACCTTGARGGYAAAGGAAAAATTTGATAACTTAGACCAAGGTATT  
TCTAGAATAAATGGTGCCTGGATTTGGAAATTCCTGCAGGGCCTTCTTCGGGAATGATTCAGGAGCTTC  
CGGAAATTCACCTTTTAGGTGAACTGAAAAATATAACGATTAAAAAATTTCTTACAAAAGTGAATCTTCA  
AGGTGGAAATCTGATTTCAACGATTTTACGTTAGATACATCGATTGCACGTTTTTGATATTACTGGAAAT  
ATTTCGATTATCGGAAAAATATGTCTTTTTCTCAACTGAATCTTAGAATTTGTCTAGAACTCGATCGCAACT  
TTGCTTTGGAAAACAGATATAGCGGATATGTTGACTCTTTTTAGAAAAACAAAGTGGAAAGTAAATGTAT  
TCCTGTGATGGGAACCTTTGGTAAACCGGATGTAATAATTCAGGACTTACTGGRCCGCCTGCGCTGCCG  
GGAACCTCCGCCAGTTCTTGGAAAGTCCGTAA

MKKEKEFPPEETALTPEEEEFLTLELQEEEEAVSRFTFKQKLILIGTGIFSLIFTVWLFPLDEI  
VRSSLYSSSVKTGTIINFRDLSISVLGNVTLDSLEVTTSSNLKIKAEAVLKTSLFLIKKKFD  
GKFKLVSLKIDTENGPLAKIRNFEGKGFNDLQGISRINGALDLEIPAGPSSGMIQELPEIPL  
LGELKNITIKKFLTKVNLQGGNLI FNDFTLDTSIARFDITGNIRLSENMSFSQLNLRICLELDR  
NFALERQDIADMLTLLEKQSGSKCIPVMGTFGKPDVKIPGLTGPPALPGTPPVPGPS

## ***gspO***

### **LOCaS 46**

ATGGGAAAGGTAATAATTTTCTGAAAGGGATTTAATCCTGTTTGTGATTGGAAAAAATGCTACCACTGA  
TCTTAGGAATTTACTTTTTGTATTCAAGCGAAACGATGTCGGAACCAAATTTCTTTTCGTTGGAAGGACGG  
AGAAATTTGTTGTAACGGTAAAGCTTATAATCGGCAGATCTATTTCCGGCACAAAAAAGTTAGTCACTTT  
GCAAATTTGGGAAAAATATCGAAAAACTATTCCTATCACCCGATAAAAAAAGTTTAGTCTGTTTATCATCGGG  
CCGACAAAAGAAAAATTTATCGTCTGACTCTTTTTTCGTTTTGAAACGCGAAATCATACTTTAGTTCGCAG  
CATCCAACCGGGAATGGCTTGTACGATCTATTTCTGGTATAGGGATAAAATTTATATTTAAAACCGGCACG  
ACGGGAGGTGGAACATATCTAACCTACTATGATAAAAAATCTAAAAAAGATAAACGAAATCAATTTCTTATC  
ACTTTTATGTGGATCGTAGCTTAGGAATCGCTCTTGCATCTCCCGTCTATGGGCCCGATGACGGAAAAT  
TTGGATCTACAGTTTATATTTCCGTAAAATAATTGAACTTTTCGATTACAAAAAAGAAATGAATGAGAAT  
TACACAATTACGGATTTGAAAAAATTTGGCGTCTATAAATTTATGATCCGAATTTCCGGTTACCATACAG  
AACGAACGAAGACTTTTTATTAATATATATTCGAAAATGCGTTAA

MGKVKFSELDLILFVDWKKMLPLILGIYFLYSSETMSEPNSFRWKDGEIVVNGKAYNRQIYFRHKLSHF  
ANWENIEKLFSLPDKKSLVVYHRADKEKFRYRLTLFRFETRNLVRSIQPGMACHDLFWYRDKIIFKTGT  
TGGGTYLTYDKNLKKINEINSYHFYVDRSLGIALASPVYGPDDGKFWIYSLYSGKIIETFYKEMNEN  
YITIDLKKI GAHKFMIRISGYHTERTKTFIKNIPKMR

### **Hond Utrecht IV**

ATGGGAAAGGTAATAATTTTCTGAAAGGGATTTAATCCTGTTTGTGATTGGAAAAAATGCTACCACTGA  
TCTTAGGAATTTACTTTTTGTATTCAAGCGAAACGATGTCGGAACCAAATTTCTTTTCGTTGGAAGGACGG  
AGAAATTTGTTGTAACGGTAAAGCTTATAATCGGCAGATCTATTTCCGGCACAAAAAAGTTAGTCACTTT  
GCAAATTTGGGAAAAATATCGAAAAACTATTCCTATCACCCGATAAAAAAAGTTTAGTCTGTTTATCATCGGG  
CCGACAAAAGAAAAATTTATCGTCTGACTCTTTTTTCGTTTTGAAACGCGAAATCATACTTTAGTTCGCAG  
CATCCAACCGGGAATGGCTTGTACGATCTATTTCTGGTATAGGGATAAAATTTATATTTAAAACCGGCACG  
ACGGGAGGTGGAACATATCTAACCTACTATGATAAAAAATCTAAAAAAGATAAACGAAATCAATTTCTTATC  
ACTTTTATGTGGATCGTAGCTTAGGAATCGCTCTTGCATCTCCCGTCTATGGGCCCGATGACGGAAAAT  
TTGGATCTACAGTTTATATTTCCGTAAAATAATTGAACTTTTCGATTACAAAAAAGAAATGAATGAGAAT  
TACACAATTACGGATTTGAAAAAATTTGGCGTCTATAAATTTATGATCCGAATTTCCGGTTACCATACAG  
AACGAACGAAGACTTTTTATTAATATATATTCGAAAATGCGTTAA

MGKVKFSELDLILFVDWKKMLPLILGIYFLYSSETMSEPNSFRWKDGEIVVNGKAYNRQIYFRHKLSHF  
ANWENIEKLFSLPDKKSLVVYHRADKEKFRYRLTLFRFETRNLVRSIQPGMACHDLFWYRDKIIFKTGT  
TGGGTYLTYDKNLKKINEINSYHFYVDRSLGIALASPVYGPDDGKFWIYSLYSGKIIETFYKEMNEN  
YITIDLKKI GAHKFMIRISGYHTERTKTFIKNIPKMR

## ***gspP***

### **LOCaS 46**

TTGGATTTCAATTTTATTAAAAATAAACTTTAATATTTTTGAATCTATACTGAATTGGTTTTATAACGAGA  
TATGTATTTTGATGAATAAAAAATTTAAAAATCAATTATAGACGTTACGGATTTTTTAATCAAAAACGACGT  
TTCCGGTGCTAAAGAAATCATTAATGTTTCATTATCCGCATAAAATTTATTTTCATATTAAAAAAGTTATCC  
ACCTTTAAAAAACTGA

### **Hond Utrecht IV**

TTGGATTTCAATTTTATTAAAAATAAACTTTAATATTTTTGAATCTATACTGAATTGGTTTTATAACGAGA  
TATGTATTTTGATGAATAAAAAATTTAAAAATCAATTATAGACGTTACGGATTTTTTAATCAAAAACGACGT  
TTCCGGTGCTAAAGAAATCATTAATGTTTCATTATCCGCATAAAATTTATTTTCATATTAAAAAAGTTATCC  
ACCTTTAAAAAACTGA

## ***gspQ***

### **LOCaS 46**

GTGATCGTTCCGATCGCGAAAGGCGGTTCTGATTCTTATGAAAATTTAATTACTACCTCTATGGAAAATA  
ATTTATTAAAAATTTAATTTTCTATTAAATGAGATTGAGTTTGTAATTAAGGAAAAAGGAAATCTTAAAAA  
TTGGAATGGCTTAATTGACTGGTATAAATCTTACATTCAAGATAAATCGATAGAATTTTTTGGACGATTCC  
ATGAAGAGATGGCATAATGCTTTGATTTCGTTATGAAAAAGAAAATGGTGAATGTAA

### **Hond Utrecht IV**

GTGATCGTTCCGATCGCGAAAGGCGGTTCTGATTCTTATGAAAATTTAATTACTACCTCTATGGAAAATA  
ATTTATTAAAAATTTAATTTTCTATTAAATGAGATTGAGTTTGTAATTAAGGAAAAAGGAAATCTTAAAAA  
TTGGAATGGCTTAATTGACTGGTATAAATCTTACATTCAAGATAAATCGATAGAATTTTTTGGACGATTCC  
ATGAAGAGATGGCATAATGCTTTGATTTCGTTATGAAAAAGAAAATGGTGAATGTAA

# Apéndice 4 ALINEACIONES DE LAS CEPAS LOCaS 46 Y HOND UTRECHT IV CON EL PROGRAMA SEQUENCHER



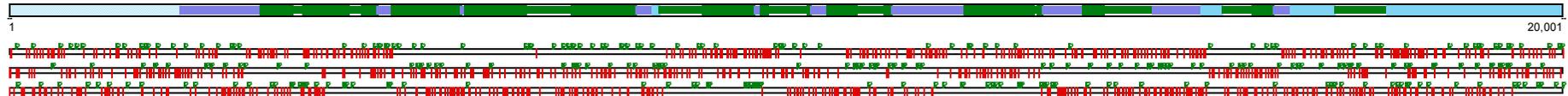
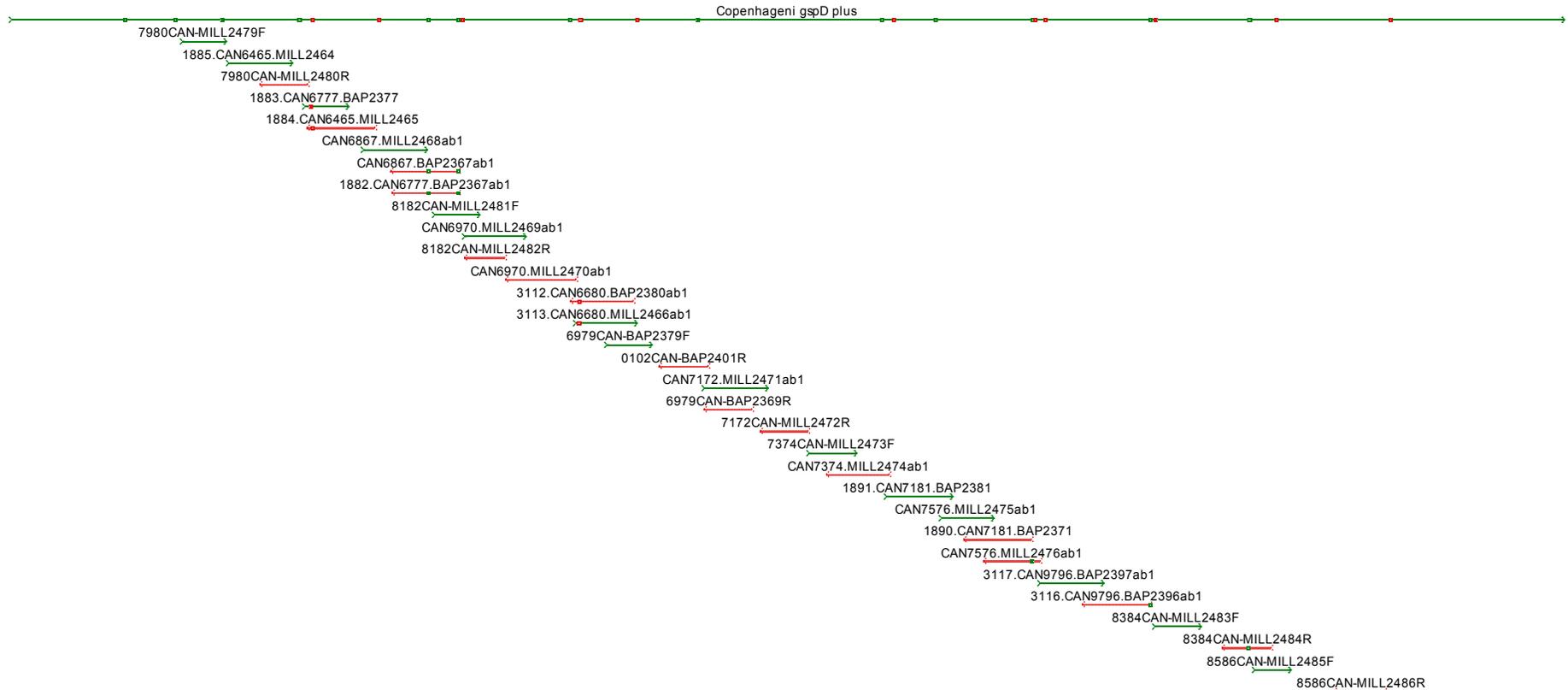


Diagram Key			
	Hole in contig		Bumps on fragments show motifs, hollow rectangles show features
	Single fragment		
	Multiple fragments same direction		
	Both strands		
	Both strands plus		
	Start oodon frame 1		
	Stop codon frame 2		