



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**  
**“INMUNOGENICIDAD DE UNA BACTERINA ELABORADA CON UNA CEPA  
AUTÓCTONA (MEXICANA) DE *Leptospira interrogans* SEROVARIEDAD  
Canicola”**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

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

**LUZ OLIVIA CASTILLO SÁNCHEZ**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**DR. ALEJANDRO DE LA PEÑA-MOCTEZUMA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:**

**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
FES-CUAUTITLÁN**

**DR. EDGAR ZENTENO GALINDO  
FACULTAD DE MEDICINA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIA

A mis padres Cayetano Castillo Rodríguez† y Apolonia María de Lourdes Sánchez Ramos, no existen palabras suficientes para agradecerles todo lo que me han dado en la vida, los amo inmensamente.

A mis hermanos Elisabeth, Leonardo y Magdalena por compartir los momentos dulces y amargos de la vida.

Con mucho amor a Carlos, gracias por compartir tu vida conmigo. Para Arturo y ese nuevo ser que viene en camino, los frutos de nuestro amor, los motivos para ir tras nuevos sueños, soñar despiertos y que al despertar nos iluminan con una sonrisa, nos endulza la vida y aumenta nuestra fe.

Al Dr. Alejandro, gracias por estos 9 años de convivencia, amistad, confianza, consejos, apoyo personal en todo momento, por ser parte de mi formación académica y personal.

A la Dra. María Teresa Quintero, Dr. Ricardo Moreno Chan, Dra. Rosa Elena Miranda, Dr. María Antonieta Mujica y Dr. Mirna Vicencio, por su amistad y apoyo.

A ellos y a todos quienes me enseñaron a vivir y no claudicar en los momentos difíciles, así como no desistir de mis ideas y proyectos.

A la memoria de todos los animales que me enseñaron tantas cosas soportando todo sin queja alguna.

*No hay secretos para el éxito, este se alcanza preparándose,  
trabajando arduamente y aprendiendo del fracaso.*

**Colin Powell**

## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, al Programa de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, al Departamento de Microbiología e Inmunología y a la Unidad de Servicios de Diagnóstico y Constatación del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano.

A mi tutor Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma por la oportunidad de realizar este proyecto profesional.

A los miembros del comité tutorial: Dr. Edgar Zenteno Galindo y Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo por su crítica y sus apreciables consejos al proyecto de investigación.

A los doctores Laura Cobos Marin, Jorge Isaac Torres Barranca, Víctor Manuel Banda Ruiz y Gilberto Chávez Gris por aceptar ser parte del jurado de examen de grado y por el enriquecimiento al trabajo escrito.

A mis compañeros y amigos del GrILLep: Ernesto Armando Rodríguez Reyes, Rodrigo Mena Bañuelos, Jorge Alejandro Rodríguez Jiménez, José Manuel Ramírez Ortega, Carlos Alfredo Carmona Gasca, Mario Hidalgo Ruíz, Horacio Mena González, José de Jesús Sotomayor Bonilla, Roció Rosario Limón Ávila, Erika Margarita Carrillo Casas, Erika Odilia Flores Popoca, Luz Elena Alcaraz Sosa, Roció Chaves Trejo, Veronica Montes de Oca Basilio, Tania Simental Rivera, Alma Flor Islas Rueda, Lilia Patricia López Huitrado, Diana Rodríguez González, Raquel Rojano Ríos, Julio Hernández, Karla Mollinedo, Raúl Mendoza, Karina Hernandez, Martha Juárez y Veronica Rojas.

Al personal de la USEDICO y CEIEPAA, por su apoyo en todo momento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado a través de la beca para estudios de maestría número 225556. Así como el financiamiento por los proyectos: PAPIIT IN222806 “GspD la supuesta proteína del T2S de *Leptospira*”, PAPIIT IN221409 “Inmunogenicidad de la secretina GspD y otros componentes del sistema de secreción tipo 2 (T2S) de *Leptospira*”, Macroproyecto no. 7, UNAM, área 2. Seroepidemiología de enfermedades infecciosas.

# ÍNDICE

<b>Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>2</b>
<b>1 Introducción.....</b>	<b>3</b>
1.1 Agente etiológico.....	4
1.2 Clasificación.....	6
1.3 Factores de virulencia.....	7
1.4 Transmisión y epidemiología.....	8
1.5 Patogenia.....	8
1.6 Leptospirosis en animales domésticos.....	9
1.7 Leptospirosis en animales de experimentación.....	14
1.8 Biológicos contra <i>Leptospira</i> en humanos.....	20
1.9 Biológicos contra <i>Leptospira</i> en animales.....	22
1.10 Respuesta inmunológica.....	28
1.10.1 Inmunidad innata.....	29
1.10.2 Inmunidad adquirida humoral.....	32
1.10.3 Colaboración celular en la respuesta humoral.....	34
1.10.4 Memoria inmunitaria.....	36
1.11 Respuesta inmunológica contra <i>Leptospira</i> .....	37
1.12 Adyuvantes.....	38
<b>2 Justificación.....</b>	<b>41</b>
<b>3 Hipótesis.....</b>	<b>43</b>
<b>4 Objetivos.....</b>	<b>44</b>
4.1 Objetivo general.....	44
4.2 Objetivos específicos.....	44
<b>5 Material y Métodos.....</b>	<b>45</b>
<b>5.1 Animales.....</b>	<b>45</b>
<b>5.2 Cepas bacterianas.....</b>	<b>45</b>
<b>5.3 Cálculo de la dosis letal 50% (DL50).....</b>	<b>46</b>
5.3.1 Colección de muestras.....	47
5.3.2 Procesamiento de muestras.....	48
5.3.2.1 Estudio bacteriológico.....	48
5.3.2.2 Estudio serológico: Aglutinación microscópica (AM).....	49
5.3.2.3 Estudio molecular: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	51
<b>5.4 Formulación de bacterinas.....</b>	<b>54</b>
5.4.1 Medio y Método de cultivo.....	54
5.4.2 Prueba de esterilidad.....	54
5.4.3 Elaboración de las bacterinas.....	55
5.4.4 Prueba de inocuidad.....	56
<b>5.5 Prueba de potencia para las bacterinas con cuentas de <math>2.4 \times 10^8</math> leptospiras/ml.....</b>	<b>56</b>
5.5.1 Grupos de animales.....	56

5.5.2 Esquema de inmunización.....	57
5.5.3 Desafío.....	59
5.5.4 Colección de muestras.....	59
5.5.5 Evaluación de la respuesta inmune humoral.....	60
5.5.5.1 Aglutinación Microscópica (AM).....	60
5.5.5.2 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).....	60
<b>5.6 Prueba de potencia para las bacterinas con cuentas de <math>2.4 \times 10^9</math></b>	
<b>leptospiras/ml.....</b>	<b>62</b>
5.6.1 Grupos de animales.....	62
<b>6 Resultados.....</b>	<b>64</b>
6.1 Cálculo de la dosis letal 50% (DL50).....	64
6.2 Formulación de bacterinas.....	73
6.3 Estandarización de la prueba de ELISA.....	73
6.4 Prueba de potencia para las bacterinas con cuentas de $2.4 \times 10^8$	
leptospiras/ml.....	74
6.5 Prueba de potencia para las bacterinas con cuentas de $2.4 \times 10^9$	
leptospiras/ml.....	83
<b>7 Discusión.....</b>	<b>90</b>
<b>8 Conclusiones.....</b>	<b>104</b>
<b>9 Bibliografía.....</b>	<b>106</b>
<b>10 Apéndice I: Medios de cultivo para <i>Leptospira</i>.....</b>	<b>125</b>
<b>11 Apéndice II: Soluciones para la prueba de ELISA y Aglutinación</b>	
<b>Microscópica.....</b>	<b>130</b>
<b>12 Apéndice III: Datos crudos de la dosis letal 50% (DL50%).....</b>	<b>134</b>
<b>13 Apéndice IV: Datos crudos de la prueba de potencia para las bacterinas</b>	
<b>con cuentas de <math>2.4 \times 10^8</math> leptospiras/ml.....</b>	<b>139</b>
<b>14 Apéndice V: Datos crudos de la prueba de potencia para las bacterinas</b>	
<b>con cuentas de <math>2.4 \times 10^9</math> leptospiras/ml.....</b>	<b>146</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Microfotografía electrónica de barrido de <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Icterohaemorrhagiae cepa RGA.....	5
<b>Figura 2:</b> Microfotografía con tinción negativa con ácido fosfotúngstico al microscopio electrónico de transmisión de <i>Leptospira biflexa</i> serovariedad Andamana cepa JNS.....	5
<b>Figura 3:</b> Hámster inoculado con la serovariedad Canicola de <i>L. interrogans</i> cepa LOCaS46.....	16
<b>Figura 4:</b> Tejido renal de hámsteres infectados con <i>L. kirschneri</i> obtenidos 10 y 28 días después de la infección.....	17
<b>Figura 5:</b> Lesiones en cobayos inoculados con <i>Leptospira interrogans</i> serogrupo Icterohemorrhagiae serovariedad Copenhageni.....	19
<b>Figura 6:</b> Pulmones de cobayos inoculados con <i>L. interrogans</i> serovariedad Lai.....	20
<b>Figura 7:</b> Eutanasia de hámsteres y colección de muestras.....	50
<b>Figura 8:</b> Condiciones de temperatura y tiempo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	54
<b>Figura 9:</b> Cronograma de inmunización y colección de muestras para la prueba de potencia de las bacterinas con cuentas de $2.4 \times 10^8$ y $2.4 \times 10^9$ microorganismos/ml.....	58
<b>Figura 10:</b> PCR positivo de hámsteres infectados con 100 leptospiras de la cepa LOCaS46 que murieron durante el desafío.....	65
<b>Figura 11:</b> Reaislamiento de <i>Leptospira</i> en medio Fletcher a partir de macerado de riñón del hámster 2 infectado con 5 microorganismos de la cepa LOCaS46...	66
<b>Figura 12:</b> Porcentaje de sobrevivencia de los 4 grupos de hámsteres para el cálculo de la DL50.....	68
<b>Figura 13:</b> Signos clínicos y lesiones macroscópicas en hámsteres infectados con la cepa LOCaS46 de <i>L. interrogans</i> (DL50).....	71
<b>Figura 14:</b> Porcentaje de sobrevivencia postdesafío de los 6 grupos de hámsteres de la prueba de potencia para las bacterinas con cuentas de $2.4 \times 10^8$ leptospiras/ml.....	80
<b>Figura 15:</b> Respuesta inmunológica inducida en hámsteres por las bacterinas con cuentas de $2.4 \times 10^8$ microorganismos/ml.....	82
<b>Figura 16:</b> Porcentaje de sobrevivencia postdesafío de los 4 grupos de hámsteres de la prueba de potencia para las bacterinas con cuentas de $2.4 \times 10^9$ leptospiras/ml.....	87
<b>Figura 17:</b> Respuesta inmunológica inducida en hámsteres por las bacterinas con cuentas de $2.4 \times 10^9$ microorganismos/ml.....	89

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1:</b> Distribución de hámsteres ( <i>Mesocricetus auratus</i> ) por grupo para calcular la DL50.....	47
<b>Cuadro 2:</b> Interpretación para la prueba de aglutinación microscópica.....	51
<b>Cuadro 3:</b> Secuencias de iniciadores utilizados en la PCR y su posición en el genoma de <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Lai.....	52
<b>Cuadro 4:</b> Mezcla de reactivos para PCR.....	53
<b>Cuadro 5:</b> Grupos de hámsteres para la prueba de potencia para las bacterinas con cuentas de $2.4 \times 10^8$ leptospiras/ml.....	57
<b>Cuadro 6:</b> Grupos de hámsteres para la prueba de potencia para las bacterinas con cuentas de $2.4 \times 10^9$ leptospiras/ml.....	63
<b>Cuadro 7:</b> Datos para el cálculo de la DL50 de la serovariedad Canicola cepa LOCaS46.....	69
<b>Cuadro 8:</b> Lesiones observadas durante la DL50.....	72
<b>Cuadro 9:</b> Resultados de la prueba de potencia para las bacterinas con cuentas de $2.4 \times 10^8$ leptospiras/ml.....	79
<b>Cuadro 10:</b> Resultados de la prueba de potencia para las bacterinas con cuentas de $2.4 \times 10^9$ leptospiras/ml.....	86

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AM	Aglutinación microscópica
CFR	Code of Federal Regulations
CID	Coagulación intravascular diseminada
CO	Campo oscuro
DL50	Dosis Letal 50%
DO	Densidad óptica
ELISA	Enzyme-linked immunoabsorbent assay / Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
EMJH	Ellinghausen y McCullough modificado por Johnson y Harris
FcR	Receptor Fc
g	Gramos
h	Hora/Horas
HE	Hematoxilina y Eosina
Ig	Inmunoglobulina
IHA	Inhibición de la hemoaglutinación
IHQ	Inmunohistoquímica
IF	Inmunofluorescencia
INF	Interferón
IP	Intraperitoneal
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
min	Minutos
ml	Mililitro
mm	Milímetros
N	Normal
nm	Nanómetros
OMP/ OMPs	Proteína de membrana externa/Proteínas de membrana externa
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PRR	Receptores de Reconocimiento de Patrón
p/v	Peso/Volumen
SAF	Solución amortiguadora de fosfatos
SC	Subcutánea
seg	Segundos
SSF	Solución Salina Fisiológica
SV/SVs	Serovariedad /Serovariedades
TLR	Toll-Like Receptor (Receptor Tipo Toll)
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
v/v	Volumen/Volumen
xg	Gravedades

## RESUMEN

Actualmente el género *Leptospira* enlista a más de 260 serovariedades patógenas y la base de esta diversidad antigénica es la variación en la estructura y composición del lipopolisacárido (LPS). La inmunodominancia del LPS determina que las bacterinas induzcan inmunidad humoral dirigida a epítopes serogrupo/serovariedad específicos. Se conoce que al utilizar aislados regionales de *Leptospira* como inmunógenos se obtiene una mejor protección comparada con inmunógenos elaborados con cepas de referencia. En el presente trabajo se realizó una comparación de la protección conferida por bacterinas elaboradas con la cepa de referencia Hond Utrecht IV (CHU-IV) y un aislado virulento cepa LOCaS46 (atenuada CL46-I, virulenta CL46-V y virulenta con adyuvante CL46-VA), ambas pertenecientes a la serovariedad Canicola de *L. interrogans*. Las bacterinas se evaluaron mediante las pruebas de esterilidad, inocuidad en cobayos (*Cavia porcellus*) y potencia en hámster sirio (*Mesocricetus auratus*), realizándose dos experimentos; el primero con  $2.4 \times 10^8$  leptospiras/ml (6 grupos de animales) y el segundo con  $2.4 \times 10^9$  leptospiras/ml (4 grupos de animales). Se aplicaron dos inmunizaciones por vía subcutánea (días 0 y 14), con una dilución 1/80 de la dosis en un volumen final de 0.25 ml; 14 días después de la segunda inmunización los hámsteres se desafiaron por vía intraperitoneal con 200 dosis letales 50% (1,000 leptospiras), de la cepa LOCaS46. La respuesta inmune humoral se evaluó mediante las pruebas de aglutinación microscópica (AM) y ELISA, el estado de portador se determinó mediante el cultivo bacteriológico en medio Fletcher y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de riñón e hígado. La prueba de inocuidad demostró que los biológicos no produjeron reacciones indeseables en los cobayos. Los hámsteres inmunizados con las bacterinas con  $2.4 \times 10^8$  leptospiras/ml, registraron una mortalidad del 60% en el Grupo 1, bacteria CHU-IV; 50% en el Grupo 2, bacteria CL46-I; 70% en el Grupo 3, bacteria CL46-V y 100% en el Grupo 4, bacteria CL46-VA; en los Grupos 5 y 6 Testigo adyuvante hidróxido de aluminio y solución salina fisiológica, murieron el 100% de los animales. Las pruebas de AM y ELISA no detectaron anticuerpos en los sueros después de la primera y segunda inmunizaciones, sin embargo los animales sobrevivientes al desafío mostraron títulos de hasta 1:2,560 y anticuerpos del isotipo IgM e IgG. En contraste, la prueba de potencia de las bacterinas con  $2.4 \times 10^9$  leptospiras/ml registró una mortalidad del 10% en el Grupo 7 bacteria CHU-IV y 0% en los Grupos 8 y 9, bacterinas CL46-I y CL46-V; en el Grupo 10 Testigo solución salina fisiológica, murió el 100% de los animales. La prueba de AM no detectó anticuerpos, mientras que la prueba de ELISA detectó anticuerpos del isotipo IgG después de la segunda inmunización con las bacterinas CHU-IV, CL46-I y CL46-V, los animales sobrevivientes al desafío mostraron títulos de hasta 1:1,280 y anticuerpos del isotipo IgM e IgG; además el cultivo y PCR de las muestras de riñón e hígado fueron negativos en todos los animales de los grupos inmunizados y sobrevivientes al desafío. De acuerdo con los resultados las bacterinas con  $2.4 \times 10^9$  leptospiras/ml se consideraron eficaces para evitar la muerte, la enfermedad clínica y además el estado de portador.

**Palabras clave:** Leptospirosis, Prueba de potencia, Inmunidad, Bacteria, Inmunógeno.

## ABSTRACT

Currently, the genus *Leptospira* includes more than 260 pathogenic serovars which antigenic diversity is based on the variation in the lipopolysaccharide (LPS) structure and composition. The immunodominance of LPS determines the induction of humoral immunity directed to serogroup/serovar specific epitopes. It is considered that the use of *Leptospira* regional isolates as immunogens offers better protection than that obtained with bacterins formulated with reference strains. Therefore, in this study a comparison of the protection induced with four different bacterins was made; one elaborated with the *Leptospira interrogans* serovar Canicola reference strain Hond Utrecht IV (CHU-IV); two with the serovar Canicola virulent strain LOCaS46 (a non-virulent derivative CL46-I, and the virulent variant CL46-V) and the fourth with the virulent LOCaS46 strain with adjuvant CL46-VA). Bacterins were evaluated for Sterility and Safety test in Guinea pigs (*Cavia porcellus*) and the Potency test in golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). Two experiments were conducted; the first one with a set of bacterins containing  $2.4 \times 10^8$  leptospire / ml (6 groups of animals) and the second with  $2.4 \times 10^9$  leptospire / ml (4 groups of animals). Two subcutaneous immunizations (0 and 14 days) were applied with the bacterin diluted up to 1/80 in a final volume of 0.25 ml; 14 days after the second immunization each hamster was challenged intraperitoneally with 200 lethal doses 50% (1,000 leptospire), of the LOCaS46 virulent strain. The humoral immune response was assessed by the microscopic agglutination test (MAT) and two ELISA tests, determination of a carrier status was performed by bacterial culture in Fletcher media and by the polymerase chain reaction (PCR), from kidney and liver samples. The Safety test showed that the bacterins did not produce undesirable reactions in Guinea pigs animals. The groups of hamsters immunized with  $2.4 \times 10^8$  cells / ml registered 60% of mortality in Group 1, CHU-IV; 50% in Group 2, CL46-I; 70% in Group 3, CL46-V and 100% in Group 4, CL46-VA; in the Groups 5 and 6 (adjuvant aluminum hydroxide and saline solution controls), 100% of animals died; the MAT and ELISA test detected no antibodies after the first and second immunizations. Nevertheless, hamsters that survive the challenge showed titres up to 1:2,560 of IgG and IgM antibodies. In contrary, in the potency test with the  $2.4 \times 10^9$  leptospire/ml bacterins, only a 10% of mortality was observed in Group 7 bacterin CHU-IV; 0% in the Groups 8 and 9, bacterins CL46-I and CL46-V; and in the group 10 (saline solution), died the 100% of animals. The MAT test showed no antibody titres and the ELISA test detected IgG antibodies after the second immunization with bacterin CHU-IV, CL46-I and CL46-V, nevertheless, hamsters that survived to challenge showed antibody titres up to 1:1,280 of both IgG and IgM. In addition, culture and PCR from kidney and liver samples from all the hamsters that survived in the groups immunized with  $2.4 \times 10^9$  leptospire were negative. According to these results the three bacterins with  $2.4 \times 10^9$  leptospire/ml were considered satisfactory for the protection against death, clinical disease and carrier status.

**Keywords:** Leptospirosis, Potency test, Immunity, Bacterin, Immunogen

# 1 INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana causada por espiroquetas patógenas del género *Leptospira*, que afecta tanto a mamíferos domésticos como a silvestres y es considerada una de las zoonosis más difundidas en el mundo (Faine *et al.*, 1999; Guerreiro *et al.*, 2001). Así mismo, también es considerada una enfermedad ocupacional ya que afecta a personas que se dedican a la agricultura, limpieza de drenajes, minería y aquellos que tienen contacto con animales (Leal *et al.*, 2003; Carneiro *et al.*, 2004). En humanos también es conocida como enfermedad de Weil, enfermedad de los porqueros, fiebre de los arrozales, fiebre de los cañaverales, fiebre del fango, fiebre de los pantanos, fiebre icterohemorrágica y fiebre del verano, entre otros (OMS-OPS, 1999).

El diagnóstico de leptospirosis es difícil de confirmar debido por un lado, a la gran diversidad de signos clínicos presentes en individuos enfermos, sean humanos o animales, y por otra parte, a la difícil adaptabilidad del microorganismo a las condiciones de laboratorio que lo hace de aislamiento difícil y lento (André-Fontaine, 2006). Por estos motivos, el diagnóstico se ha basado principalmente en técnicas de laboratorio indirectas como la detección de niveles altos ( $\geq 1:100$ ) de anticuerpos séricos mediante la prueba de Aglutinación Microscópica (AM) y la observación de leptospiras mediante microscopía de campo oscuro (CO), siendo esta última, una alternativa con poca sensibilidad y alto grado de inespecificidad (Smith *et al.*, 1994; Castillo-Sánchez, 2008). En todo caso, es recomendable el uso de otras alternativas de diagnóstico incluyendo las pruebas biológicas (inoculación en animales de laboratorio como hámsteres o cobayos), histopatología con tinciones argénticas (Warthin Starry o Levaditi), estudios de laboratorio clínico, otras pruebas inmunológicas como ELISA, inhibición de la hemoaglutinación (IHA), aglutinación macroscópica (AM), inmunofluorescencia (IF), inmunohistoquímica (IHQ) y más recientemente la detección de ADN de leptospiras patógenas en muestras clínicas, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Rossetti *et al.*, 2004).

En cuanto a la respuesta inmunológica, la inmunidad humoral es la principal defensa contra la infección por *Leptospira*, el lipopolisacárido estimula directamente una respuesta de tipo humoral con la producción de anticuerpos del isotipo IgM. Por tal razón, la inmunización para la prevención de la leptospirosis en diferentes especies animales es una práctica común en medicina veterinaria, por lo que hay comercialmente disponibles una gran variedad de bacterinas de leptospirosis inactivadas en suspensión. Las serovariedades (SVs) que constituyen su formulación son seleccionadas con base en la prevalencia conocida de SVs en determinada especie. Por ejemplo, en caninos las más comunes son Canicola, Grippotyphosa, Pyrogenes e Icterohaemorrhagiae; en cerdos Pomona, Bratislava y Canicola; mientras que en bovinos son las SVs Hardjo, Pomona y Tarassovi. Cabe destacar que la inmunización protege contra las SVs que contiene y otras antigénicamente similares, sin embargo, la presencia de éstas cambia de un lugar a otro por lo que la bacterina no garantiza la protección contra las SVs presentes de una zona geográfica a otra. Aunado a esto, las bacterinas no evitan el desarrollo del estado de portador con la subsiguiente eliminación del microorganismo por la orina (Schreiber *et al.*, 2005; Srivastava, 2006). También se ha mencionado que la duración de la inmunidad conferida con dichas bacterinas, es corta y la firmeza de ésta ha sido pobre (Srivastava, 2006), debido probablemente al uso de cepas de referencia de leptospirosis patógenas que han perdido su virulencia para la formulación de las bacterinas.

## 1.1 AGENTE ETIOLÓGICO

*Leptospira* es una espiroqueta, con una longitud aproximada de 5 a 20 micrómetros y un diámetro de 0.1 a 0.2 micrómetros, estrictamente aerobia, con los extremos en forma de gancho y dos endoflagelos periplásmicos que le permiten su movilidad característica (Faine *et al.*, 1999) (Figura 1). Por medio de microscopía electrónica de transmisión se pueden observar tres estructuras principales: la membrana externa o cubierta; el cilindro citoplasmático y los dos endoflagelos o filamentos axiales uno fijo en cada extremo de la célula (Babudieri, 1949). En el citoplasma de la célula se

pueden detectar material nuclear, mesosomas y gránulos electrodensos de diversos tamaños (Macedo, 2005) (Figura 2).

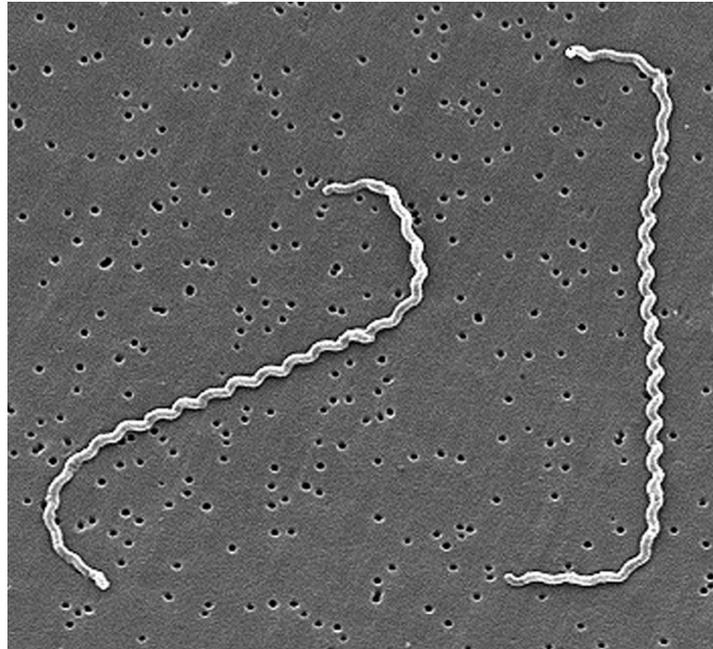


Figura 1: Microfotografía electrónica de barrido de *Leptospira interrogans* serovariedad Icterohaemorrhagiae cepa RGA sobre un filtro de membrana de 0.22 μm (Levett, 2001).

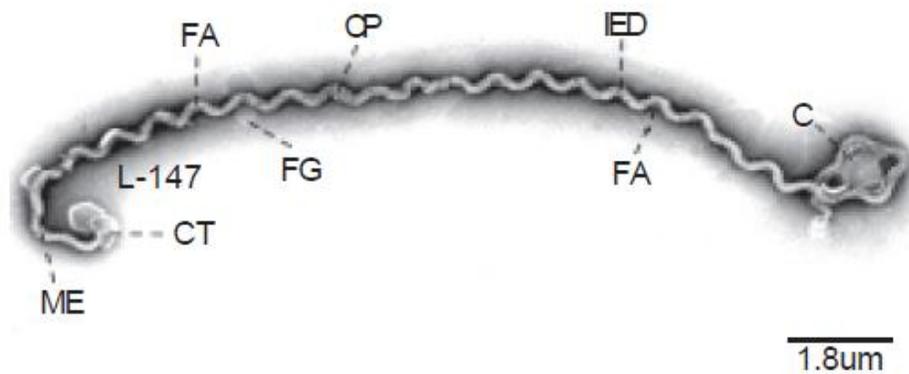


Figura 2: Microfotografía con tinción negativa con ácido fosfotúngstico al microscopio electrónico de transmisión de *Leptospira biflexa* serovariedad Andamana cepa JNS. Membrana externa (ME), estructura terminal (CT), filamento axial (FA), formación globosa (FG), cilindro protoplasmático (CP), Inclusiones electrodensas (IED). (11000x) (Macedo, 2005).

## 1.2 CLASIFICACIÓN

El género *Leptospira* pertenece al reino Procariota; división Bacteria; phylum Spirochaetes; clase Spirochaetes; orden Spirochaetales; familia Leptospiraceae. Actualmente existen catorce especies patógenas de leptospiras: *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilli*, y *L. wolffii* y seis especies de leptospiras saprófitas: *L. biflexa*, *L. kmetyi*, *L. meyeri*, *L. vanthielii*, *L. wolbachii* y *L. yanagawae*, esto de acuerdo al análisis de la secuencia de los genes del ARN ribosomal 16S (*rrs*) y a estudios de hibridación de ácidos nucleicos (Levett *et al.*, 2006; Galloway and Levett, 2008; Adler and De la Peña-Moctezuma, 2010; Adler, 2011). *Leptospira* posee un lipopolisacárido (LPS) con una composición antigénica compleja que determina su clasificación serológica (Levet, 2001), donde la serovariedad es el taxón básico de *Leptospira* y fue propuesto por Wolff y Broom en 1954, tanto para clasificar como para explicar, de forma práctica, la relación parásito-hospedador (Wolff and Broom, 1954). Esta identidad antigénica es resultante de diferencias en la estructura de las cadenas de carbohidratos del lipopolisacárido (LPS) (De la Peña-Moctezuma *et al.*, 1999; Faine *et al.*, 1999; Bulach *et al.*, 2002). Por lo tanto, la amplia lista de serovariedades de leptospiras patógenas que existe actualmente refleja la importancia de la diversidad de la estructura del LPS. Esta clasificación está basada en la respuesta serológica de *Leptospira* a sueros inmunes por medio de aglutinación-absorción y actualmente, se enlistan más de 260 serovariedades patógenas que se agrupan en 25 serogrupos. Mientras que leptospiras saprófitas agrupan actualmente a poco más de 60 serovariedades (Levett, 2001).

Es importante aclarar que ambas clasificaciones (genética y antigénica) coexisten y que la mayor parte de la investigación epidemiológica y de diagnóstico se ha realizado con base en la clasificación serológica (Faine *et al.*, 1999). En algunos casos, los miembros de diferentes especies patógenas y no patógenas son serológicamente indistinguibles y pertenecen a la misma serovariedad. Por ejemplo,

distintas cepas de la serovariedad Hardjo pertenecen a las especies *L. interrogans* (Hardjoprajitno), *L. borgpetersenii* (Hardjobovis) y *L. meyeri* (cepa Went 5), esta última no patógena (Brenner *et al.*, 1999; Levett, 2001; Adler, 2011).

### 1.3 FACTORES DE VIRULENCIA

El lipopolisacárido (LPS), es el componente de superficie más abundante en *Leptospira* y contribuye a la patología asociada con la enfermedad. A pesar de las similitudes estructurales, bioquímicas e inmunológicas con el LPS de las bacterias Gram negativas, el LPS de *Leptospira* es hasta 10 veces menos tóxico, puede activar macrófagos y actuar como un mitógeno de linfocitos B (productoras de anticuerpos) (Isogai *et al.*, 1990a; Isogai *et al.*, 1990b). La actividad endotóxica del LPS y su acción sobre monocitos (liberación de citocinas), desencadenan coagulación intravascular diseminada (CID), incluyendo hemorragias, trombocitopenia y agregación plaquetaria (Faine *et al.*, 1999).

Se demostró la producción de hemolisinas por cepas virulentas de *L. interrogans*, dado que utiliza el hierro como un factor de crecimiento fundamental (Del Real *et al.*, 1989), así como otras hemolisinas como esfingomielinasa C, fosfolipasa y hemaglutininas que causan hemoglobinuria, anemia hemolítica y daños tisulares en el hospedero (Lee *et al.*, 2002).

También se han descrito factores de adherencia asociados con proteínas de superficie como LigA que le permiten adjuntarse a la fibronectina y al colágeno de la célula del hospedero, así como a su movilidad y la presencia de la enzima hialuronidasa que le confieren una gran capacidad invasiva (Levett, 2001; Lin and Chang, 2007).

No hay evidencia de algún tipo de toxina secretada por *Leptospira*, sin embargo, el daño endotelial que se presenta ha sido asociado a la presencia misma de *Leptospira* en el tejido renal. Por otro lado se han encontrado evidencias de la capacidad de *Leptospira* para invadir células Vero e inducir apoptosis en macrófagos, pero sin definir el determinante de virulencia específico (De Brito *et al.*, 1992; Merien *et al.*, 1997).

## **1.4 TRANSMISIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA**

Las especies patógenas de *Leptospira* no se multiplican fuera del huésped y su supervivencia depende de las condiciones ambientales en las que se encuentren, por lo que es altamente susceptible a la desecación, cambios de pH y temperaturas bajas (<7-10°C) o altas (34-36°C). *Leptospira* sobrevive hasta 180 días en suelos húmedos y superficies acuosas (Martínez *et al.*, 1993). Una mayor incidencia de la enfermedad ocurre en áreas con suelos con pH alcalino, durante las estaciones húmedas, áreas de alta precipitación pluvial y en zonas con climas cálidos y húmedos. La infección en humanos y animales se da por contacto directo con orina, líquidos fetales y placentarios, descargas uterinas o material infectado o por contacto indirecto con el ambiente contaminado con leptospiras (Adler and De la Peña-Moctezuma, 2010).

El control epidemiológico de la leptospirosis es extremadamente difícil, debido a que *Leptospira* persiste por períodos prolongados en los túbulos renales con la subsecuente excreción por la orina en los animales portadores; así mismo, los animales silvestres representan un reservorio importante para el mantenimiento del microorganismo en el ambiente y un factor de riesgo para los animales domésticos y el hombre, donde la exposición ocupacional (granjeros, veterinarios, trabajadores de mataderos) y recreativa (acampantes, nadadores), son frecuentes (Radostits and Gay, 1999; Rao *et al.*, 2003).

## **1.5 PATOGENIA**

*Leptospira* penetra al organismo a través de abrasiones y heridas, piel reblandecida por humedad o por las mucosas bucal, nasal y conjuntival. Una vez que se encuentra en el torrente sanguíneo se multiplica con rapidez durante 7 a 10 días (fase de leptospiremia) y posteriormente, se disemina a todos los órganos y líquidos corporales, incluyendo el líquido cefalorraquídeo (LCR) y ojos (Dwyer *et al.*, 1995). Posteriormente, se genera la producción de anticuerpos aglutinantes y el fenómeno de opsonización, esta respuesta elimina al microorganismo de la sangre y de la mayoría

de los órganos y es en este momento cuando deja de encontrarse en sangre, alojándose en los túbulos contorneados del riñón donde posteriormente es eliminada por la orina durante semanas o meses (fase de leptospiruria) (Myers, 1985; Ellis *et al.*, 1986a). Los mecanismos por los que produce daño a los tejidos aún no están bien entendidos, pero la respuesta inmune está implicada en la patogénesis de la leptospirosis, con la formación de inmunocomplejos, liberación de citocinas y vasculitis autoinmune (Greene, 1998). Los hallazgos histopatológicos en los animales de laboratorio y en los seres humanos son muy similares a las del choque endotóxico. El LPS de *Leptospira* estimula la adherencia de neutrófilos y la activación de las plaquetas, lo que puede ser responsable de las anomalías inflamatorias y de coagulación (Morrison and Wright, 1976; Dysko *et al.*, 2002).

## 1.6 LEPTOSPIROSIS EN ANIMALES DOMÉSTICOS

**BOVINOS:** La leptospirosis produce pérdidas económicas de manera primaria por sus efectos sobre la reproducción, como mortinatos, abortos y nacimientos de crías débiles e infertilidad (Ellis, 1994). De manera secundaria, también hay pérdidas económicas como consecuencia del “síndrome de caída de la leche” o agalactia transitoria (Ellis *et al.*, 1983). Los abortos se presentan generalmente dentro de los últimos estadios de la gestación entre los 6 y los 9 meses. En animales jóvenes se puede presentar con poca frecuencia un cuadro agudo que cursa con fiebre, ictericia, hemorragias, hemoglobinuria y de curso fatal. Se considera al bovino como huésped de mantenimiento de la serovariedad Hardjo, ya que no se conoce para esta serovariedad ningún reservorio silvestre (Ellis *et al.*, 1981; Ellis *et al.*, 1983). En México ha sido ampliamente reportada la presencia de anticuerpos contra las serovariedades, Pomona, Grippotyphosa, Bratislava, Icterohaemorrhagiae y Hardjo, que son comúnmente consideradas agentes causales de leptospirosis en bovinos, sin embargo, a la fecha solo hay evidencia (aislamiento) de la infección por *L. interrogans* serovariedad Hardjo, *L. Kirschneri* serovariedad Grippotyphosa y *L. santarosai* serovariedades Tarassovi y Mini (Carmona-Gasca, 2011)

En un estudio retrospectivo realizado en el año 2006, se analizaron los resultados del diagnóstico serológico por AM de leptospirosis en bovinos obtenidos en el departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM, en el periodo comprendido entre abril de 1989 a julio del 2004, donde se reporta que de 3,556 muestras recibidas el 55.03% (1,957) fueron positivas a una o más serovariedades, las serovariedades con mayor frecuencia fueron Hardjo (806), Tarassovi (647) y Wolffi (489) con títulos  $\geq 1:100$  (Chávez-Trejo R, 2006).

La forma más frecuente de transmisión en el caso de serovariedades adaptadas al huésped como Hardjo es la transmisión horizontal directa, mientras que la transmisión horizontal indirecta tiene un papel más importante en las infecciones accidentales con otras serovariedades y se produce tras la exposición del animal a un ambiente contaminado (Ellis, 1994). Aunque la presencia de leptospiras en el semen, tracto genital del toro y en el útero de la vaca ha sido observada, la transmisión sexual no ha sido plenamente demostrada en el ganado bovino (Van der Hoeden, 1958; Ellis *et al.*, 1986b). Se ha comprobado la existencia de una transmisión vertical por vía transplacentaria y galactófora (Amatredjo and Campbell, 1975). Por lo tanto, las fuentes de infección más frecuentes para el ganado bovino son la orina, la leche, descargas postparto y potencialmente, aunque poco probable el agua y pastos contaminados con leptospiras patógenas (Van der Hoeden, 1958; Michna, 1970).

**OVINOS Y CAPRINOS:** Las serovariedades más importantes son: Pomona, Grippotyphosa y Bratislava, sin embargo, las infecciones agudas o crónicas por *Leptospira* en ovinos y caprinos raramente han sido reportadas, además se ha identificado al ganado ovino como hospedador de mantenimiento para la serovariedad Hardjo constituyendo por tanto una fuente de infección para el ganado bovino (Cousins *et al.*, 1989; Gerritsen *et al.*, 1994). También se ha reportado el aislamiento de la serovariedad Icterohaemorrhagiae a partir de orina de un ovino en Cuba, y la serología de este animal mostró títulos de 1:100 contra la misma serovariedad (Cárdenas *et al.*, 2010).

La infección aguda tiene un periodo de incubación de 4 a 6 días y está marcada por anorexia, depresión, fiebre, hemoglobinuria y hemoglobinemia; también puede causar abortos, crías débiles, mencionándose que los títulos de anticuerpos producidos por infecciones de campo son bajos, y sin embargo, la leptospirosis no causa las pérdidas económicas en las mismas dimensiones que en los porcinos y bovinos.

En un estudio retrospectivo realizado en 2006 en México, menciona que en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM, en el periodo comprendido entre abril de 1989 a julio del 2004 se trabajaron 75 muestras de ovino y 68 de caprino, de las muestras de ovino el 42.66% fueron positivas a una o más serovariedades (32 muestras) detectándose con mayor frecuencia las serovariedades Pomona (10), Ballum (7) e Icterohaemorrhagiae (6) con títulos  $\geq 1:100$ . En el caso de los caprinos el 66.17% de las muestras (45 de 68 muestras totales) fueron positivas por AM detectándose con mayor frecuencia a las serovariedades Pomona (24), Icterohaemorrhagiae (12) y Autumnalis (8) con títulos  $\geq 1:100$  (Chávez-Trejo, 2006).

**CERDOS:** La leptospirosis en cerdos ha sido reconocida como una causa seria de pérdidas económicas y un potencial riesgo en salud humana. La infección puede ser subclínica o hasta severa donde se observa fiebre, ictericia, hemorragias y posible muerte. En cerdas gestantes se presentan abortos comúnmente sin signos premonitorios o nacimiento de crías nacidas muertas o débiles o fetos momificados. La transmisión ocurre de forma directa por contacto de mucosas (nasal, conjuntival) o piel erosionada con orina de animales enfermos o portadores, o bien indirectamente a través de agua y alimento contaminado con orina de animales portadores de *Leptospira* (Miller *et al.*, 1990). Las serovariedades más comúnmente reportadas en cerdos son Bratislava, Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Sejroe y Tarassovi (Radostits and Gay, 1999).

En un estudio realizado en México, se trabajaron 168 muestras de cerdas en diferentes tercios de gestación y 68 muestras de cerdos (machos y hembras) destinados para abasto (236 muestras totales), reportando que por medio de la prueba de AM se detectaron 159 muestras positivas a una a más serovariedades, siendo las

serovariedades con mayor frecuencia Bratislava 55.5%, Icterohaemorrhagiae 21.6%, Canicola 20.8%, Grippotyphosa 14.4%, Hardjo 8.8% y Pomona 7.2% (Ramírez-Ortega JM, 2008).

**EQUINOS:** La presentación clínica de leptospirosis en equinos se ha asociado primariamente a uveítis con secuelas recurrentes, aunque hay reportes esporádicos de daño hepático y renal. Sin embargo, también se han mencionado casos de aborto y enfermedad neonatal por leptospirosis. Las serovariedades más comúnmente asociadas a equinos son Pomona y Bratislava (Bernard, 1993).

En la presentación usual de leptospirosis equina se observa fiebre moderada acompañada de anorexia, en algunas formas severas hay sufusión conjuntival, petequias en mucosas, hemoglobinuria, anemia, ictericia, depresión y debilidad aparente. La signología observada en yeguas gestantes dependerá de la etapa de gestación en la que ocurra la infección, así como, al estado inmunológico en el que se encuentre. Cuando ocurre un aborto, en la placenta se puede observar vasculitis, trombosis e infiltrado de células inflamatorias, en el feto se puede detectar disociación hepatocelular con infiltrado leucocitario, nefritis supurativa y no supurativa, hemorragias pulmonares, neumonía y miocarditis (Hodgin *et al.*, 1989; Poonacha *et al.*, 1993). En potros neonatos infectados en el útero pueden observarse signos clínicos severos y muerte (Hogan *et al.*, 1996).

En un estudio realizado en 1998, se analizaron 106 sueros de equinos de la sección de veterinaria del Instituto Nacional de Higiene (Tecamac, Estado de México), destinados a la producción de sueros hiperinmunes contra veneno de alacrán y víbora (cascabel y nauyaca), toxinas (tetánica y diftérica) y virus de la rabia. La prueba de AM mostró que el 83% de los animales (88 de 106) fueron positivos con títulos de 1:100 a una o más serovariedades, siendo las de mayor frecuencia Autumnalis, Australis, Pomona e Icterohaemorrhagiae. Sin embargo, las serovariedades con los títulos más altos fueron Autumnalis, Pyrogenes y Cynopteri (1:6,400) y Australis, Celledoni, Szwajizak e Icterohamerrhagiae (1:3,200). En este estudio descartaron reacciones inespecíficas debido al estado inmunológico de los equinos, mediante la

inmunización de conejos con los antígenos utilizados en los equinos (0.5 ml de cada antígeno por vía SC cada 7 días durante un mes), estos sueros fueron examinados por la prueba de AM y no mostraron anticuerpos aglutinantes contra *Leptospira* (López *et al.*, 1998).

**PERROS:** Los signos clínicos de la leptospirosis canina pueden ser desde inaparentes hasta severos e incluso llegar a la muerte; sin embargo, los signos clínicos se relacionan con la edad e inmunidad del hospedero. La signología se puede observar inicialmente durante el periodo de leptospiremia e invasión a tejidos. El grado de lesión a los órganos internos varía según la virulencia de la serovariedad y la susceptibilidad del hospedero.

Las manifestaciones clínicas también varían entre brotes y áreas geográficas con una serovariedad específica prevalente (Greene, 1998; Dysko *et al.*, 2002). En perros se han definido por lo menos tres síndromes: hemorrágico, icterico y urémico, pero se puede agregar un cuarto síndrome abortivo o nacimiento de crías débiles. En general se observan cuadros clínicos variables que pueden ser agudo, subagudo, crónico y un cuadro subclínico. Si la infección ocurre en hembras gestantes, *Leptospira* puede penetrar y replicarse en la placenta y feto causando la muerte y aborto o nacimientos prematuros o reabsorción fetal o fetos momificados. En el caso de que la infección ocurra al término de la gestación también puede causar el aborto o el nacimiento de crías infectadas débiles (Timoney *et al.*, 1988).

Hemos reportado que los perros son portadores renales persistentes de la serovariedad Canicola, en estos animales la infección renal persiste y la eliminación del microorganismo en orina es a largo plazo. Perros portadores asintomáticos eliminadores de leptospiras patógenas, usualmente muestran títulos elevados de anticuerpos contra una o más serovariedades ( $\geq 1:1,600$ ) (Castillo-Sánchez, 2008). Sin embargo, aún no se determina el tiempo que dura la excreción de otras serovariedades en caninos (Rentko *et al.*, 1992).

## 1.7 LEPTOSPIROSIS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

**HÁMSTER:** En general los hámsteres han sido empleados como animales de experimentación desde los años 30 y las especies utilizadas incluyen al *Mesocricetus auratus* (Sirio o Dorado), *Cricetulus griseus* (Chino), *Cricetulus migratorius* (Armenio), *Cricetus cricetus* (Europeo), *Phodopus campbelli* (especie enana rusa) y *Phodopus sungorus* (especie enana siberiana) (Claire and Van, 2002). En particular para el estudio de la leptospirosis, se han empleado diferentes modelos experimentales, entre ellos se pueden citar al hámster (Somenovich *et al.*, 1988), cobayo y ratón (Wakamatsu *et al.*, 1990). Sin embargo, la mayoría de los autores coinciden en que el hámster es el biomodelo más adecuado para realizar investigaciones sobre esta enfermedad, siendo el hámster sirio (*Mesocricetus auratus*) la especie más usada y se ha empleado para desarrollar investigaciones relacionadas con el proceso clínico, inmunológico y patológico de la enfermedad sobre el hospedero. Así mismo, también se han empleado en pruebas para evaluar y validar la eficacia de inmunógenos y para determinar patogenicidad y virulencia de los diferentes aislados de *Leptospira* (Faine *et al.*, 1999).

El hámster presenta una gran susceptibilidad a varias especies patógenas de *Leptospira*, presentándose como una infección aguda letal produciendo la muerte en un periodo de 6 a 7 días, dependiendo del grado de virulencia de la serovariedad inoculada. Sin embargo, usualmente no son susceptibles a la serovariedad Hardjo (Randall and Cooper, 1944). Actualmente, existen solamente cuatro reportes que describen una infección aguda letal en hámster con la serovariedad Hardjo (Kingscote, 1980; Woods *et al.*, 1983; Tripathy *et al.*, 1997; Zuerner *et al.*, 2012).

La enfermedad clínica aguda se manifiesta principalmente por trastorno respiratorio, disnea, debilidad muscular, postración y en algunos casos se puede observar hemoptisis. También se pueden presentar patologías neurológicas asociadas con meningitis como incoordinación e hiperestesia presentándose entre dos y tres horas antes de la muerte (Figura 3A).

En el parénquima pulmonar macroscópicamente se observan hemorragias de leves a severas multifocales (Figura 3B) y microscópicamente, se observan hemorragias de leves a severas, infiltrado perivascular, neumonía intersticial, congestión y coagulación intravascular diseminada (CID) (Figura 3C). En riñones microscópicamente se observa nefritis intersticial, hemorragias en grado variable, degeneración tubular y necrosis (Figura 3D). Macroscópicamente se puede detectar congestión y hemorragias difusas en la superficie de la corteza renal, si los animales llegan a sobrevivir suficiente tiempo se puede observar fibrosis severa con pérdida de la anatomía y disminución de la densidad urinaria asociada con falla renal y hematuria (Figura 3E). En el hígado microscópicamente se observa degeneración hidrópica e infiltrado linfoplasmocitario y macroscópicamente hepatitis, congestión y hemorragias en grado variable (Castillo-Sánchez, 2008). En un trabajo realizado por Barnett y col, reportaron que tejido renal de hámster infectado con *L. kirschneri* obtenido 10 días después de la infección, mostró arquitectura cortical y medular intactas, con glomérulos contraídos (Figura 4B) y espacios glomerulares aumentados con material proteico, sin células inflamatorias. Los vasos sanguíneos se mostraban congestionados y un infiltrado mixto de linfocitos y células plasmáticas se pudo observar cerca de las arterias más grandes en la interfase córtico-medular. Sin embargo, este infiltrado fue poco evidente en los tejidos que rodeaban las arterias más pequeñas. A los 28 días después de la infección, se observó un infiltrado inflamatorio mixto de monocitos, linfocitos y células plasmáticas (Figura 4A) siendo más evidente en la corteza y alrededor de las arterias y arteriolas. La tinción con plata de las secciones de riñón obtenidos en el día 28 después de la infección, revelaron que los túbulos localizados en la corteza ocasionalmente contenían una acumulación densa de espiroquetas que recubrían la pared tubular (Figura 4C) y en algunos campos se observaban espiroquetas individuales en el lumen del túbulo (Figura 4D) (Barnett *et al.*, 1999). Para el aislamiento o el mantenimiento de la virulencia de *Leptospira* se recomienda inocular intraperitonealmente hámsteres de aproximadamente 4 a 6 semanas de edad o de menos de 50 g de peso (Sonrier *et al.*, 2001; WHO, 2003; Castillo-Sánchez, 2008).

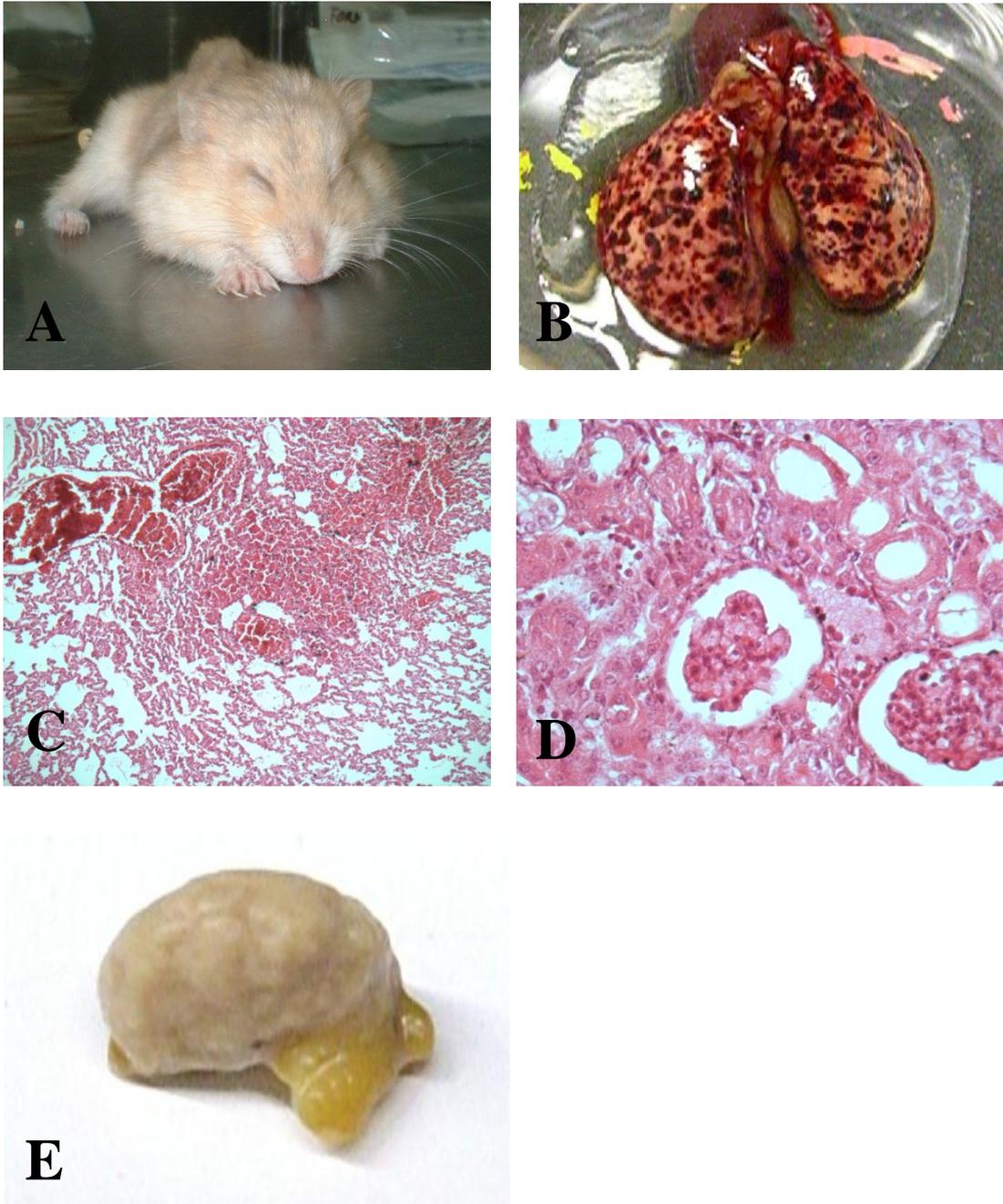


Figura 3: Hámster inoculado con la serovariedad Canicola de *L. interrogans* cepa LOCaS46. A) Postración e incoordinación. B) Hemorragias pulmonares severas multifocales. C) Pulmón: neumonía intersticial. D) Degeneración tubular moderada. E) Fibrosis renal (Castillo-Sánchez, 2008). Tinción de hematoxilina y eosina.

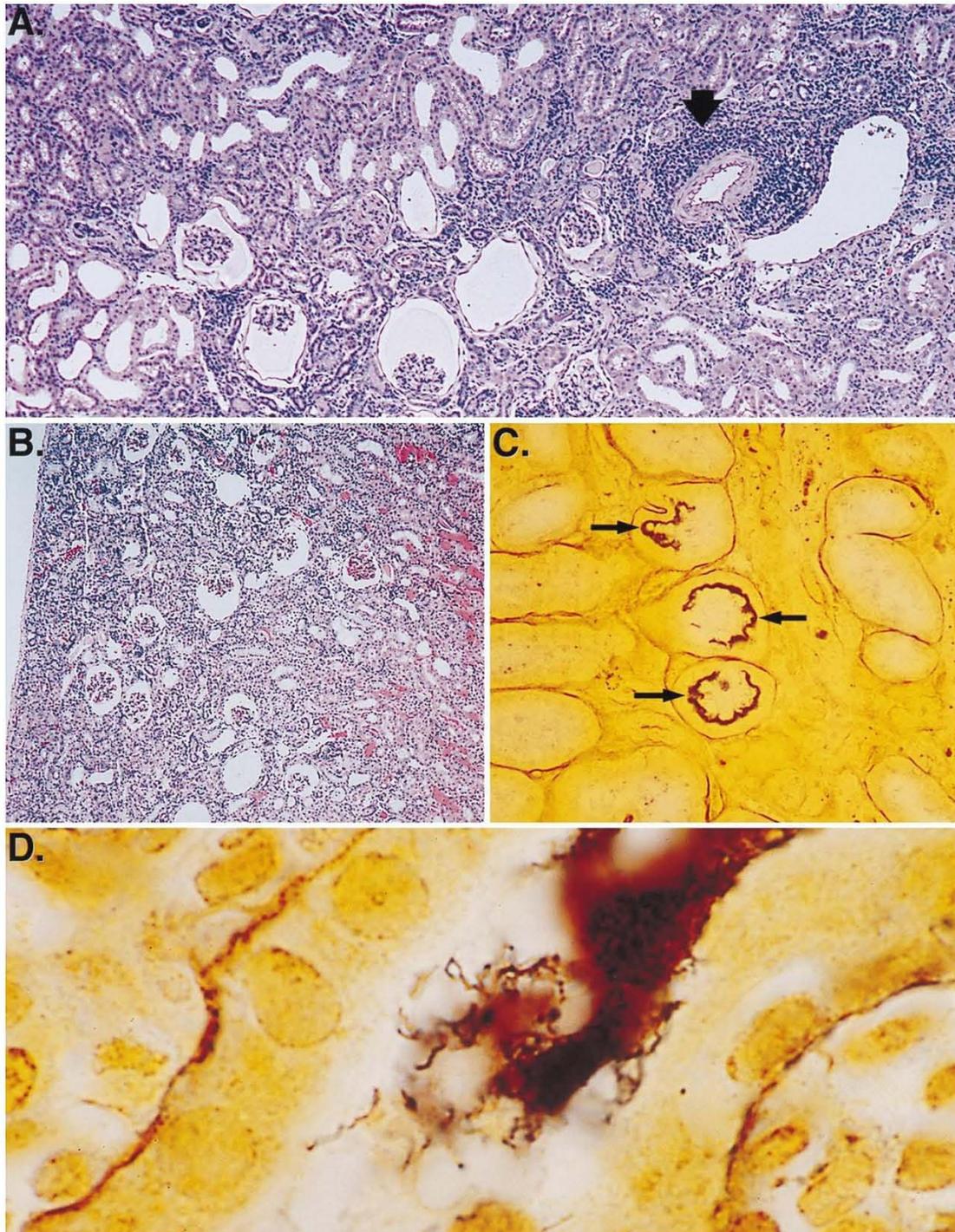


Figura 4: Tejido renal de hámsteres infectados con *L. kirschneri* obtenidos 10 y 28 días después de la infección. A) Infiltrado inflamatorio mixto de monocitos, linfocitos y células plasmáticas. B) Arquitectura cortical y medular intactas con glomerulos contraídos. C) Acumulación de espiroquetas en la pared tubular. D) Espiroquetas en el lumen del túbulo. (Tinción de hematoxilina y eosina e inmunohistoquímica) (Barnett *et al.*, 1999).

**COBAYO:** En esta especie la infección con serovariedades virulentas de *Leptospira* causa una enfermedad aguda fatal similar a la enfermedad humana severa.

En un estudio realizado por Nally y colaboradores reportaron que los aislados RJ16441 y RJ15958 de *Leptospira interrogans* serogrupo Icterohemorrhagiae serovariedad Copenhageni, obtenidos de sangre de pacientes con pulmonía hemorrágica severa, fueron altamente virulentos y que 103 microorganismos pudieron causar una infección fatal en cobayos de 150 a 200 g de peso (Nally *et al.*, 2004).

Macroscópicamente, en el parénquima pulmonar observaron áreas multifocales de hemorragias severas involucrando de un 5 a 70% de la superficie (Figura 5A), microscópicamente se detectaron hemorragias y los espacios alveolares con incremento moderado en la celularidad intersticial; también se detectaron hemorragias, equimosis y petequias generalizadas en peritoneo, corazón, estómago, intestinos y cápsula renal (Figura 5B) (Nally *et al.*, 2004).

En riñones se observó nefritis intersticial caracterizada por infiltración de neutrófilos y monocitos, necrosis de las células del túbulo y ocasionalmente células en apoptosis, los glomérulos se observaron sin cambios aparentes (Figura 5C) (Nally *et al.*, 2004).

Los hallazgos en hígado fueron necrosis de hepatocitos, disociación celular, hepatocitos con actividad mitótica incrementada y binucleados, hiperplasia e hipertrofia de células de Kupffer y un incremento moderado en el número de monocitos y neutrófilos (Figura 5D). Esto hallazgos fueron observado en todos los animales infectados, pero fueron más aparentes en aquellos que se inocularon con la cepa RJ15958 (Nally *et al.*, 2004). En bazo se pudo observar activación del sistema reticuloendotelial con un incremento de la hemofagocitosis e histiocitos localizados principalmente en la pulpa roja (Figura 5E) (Nally *et al.*, 2004).

En un estudio realizado por Hong-Liang y colaboradores, se analizaron los cambios patológicos y hematológicos en cobayos después de 24, 48 y 96 horas postinfección por vía intraperitoneal con una concentración de  $5 \times 10^8$  leptospiras/ml de la cepa 56601 de la serovariedad Lai de *L. interrogans* serogrupo Icterohaemorrhagiae (Hong-Liang *et al.*, 2006).

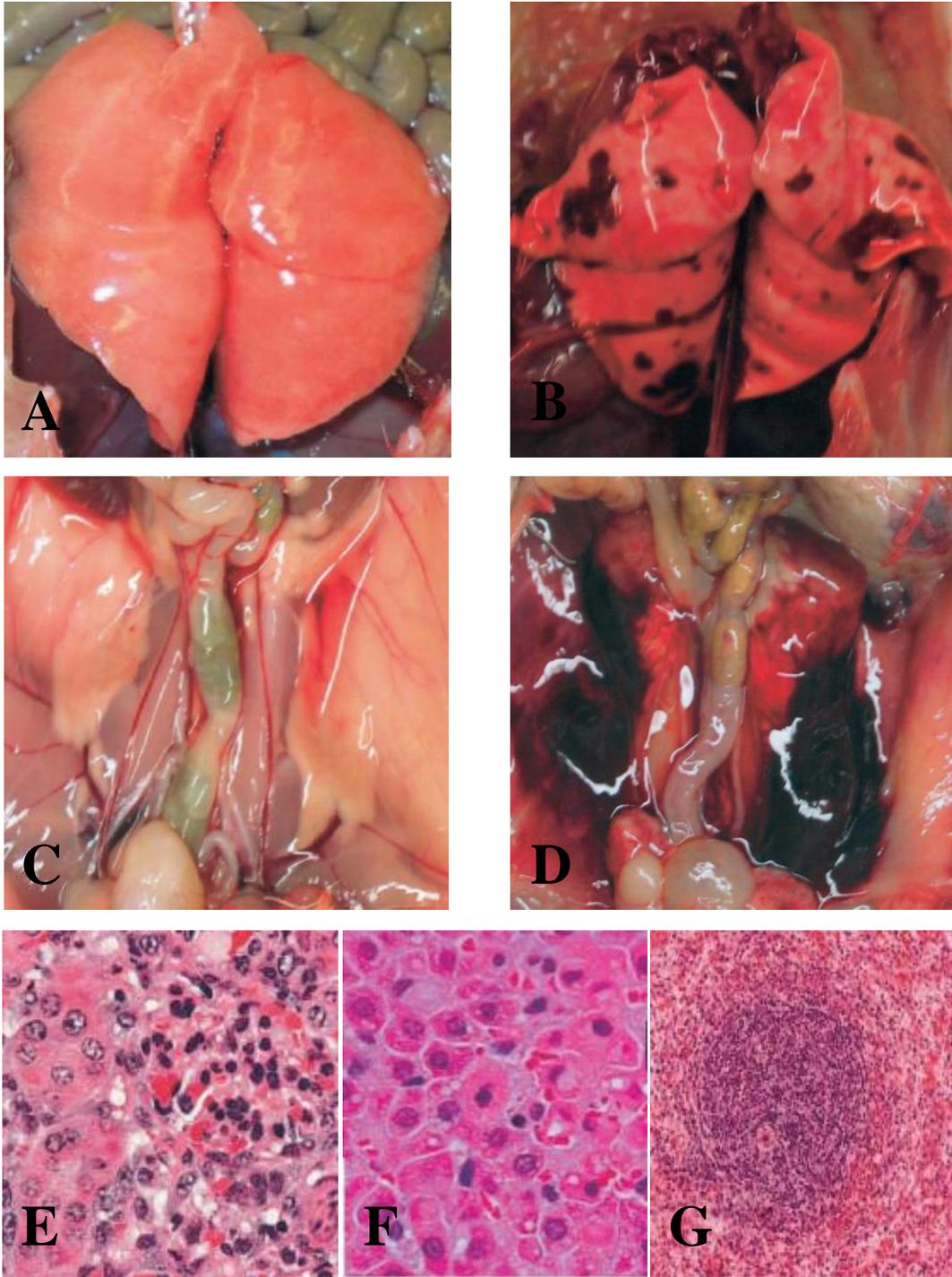


Figura 5: Lesiones en cobayos inoculados con *Leptospira interrogans* serogrupo Icterohemorrhagiae serovariedad Copenhageni. A) Pulmones sin lesiones. B) Hemorragias pulmonares. C) Superficie peritoneal sin lesiones. D) Hemorragias en peritoneo. E) Riñón con infiltrado intersticial inflamatorio con neutrófilos. F) Necrosis de hepatocitos. G) Bazo con hiperplasia de centros germinales (Nally *et al.*, 2004).

En el parénquima pulmonar se observaron macroscópicamente hemorragias 24 horas después de la infección, que aumentaron en severidad en los animales con mayor tiempo de exposición al microorganismo (Figura 6), cortes histológicos realizados después de 24 horas postinfección mostraron leves hemorragias alveolares, que después de 96 horas formaban extensas áreas hemorrágicas, con moderado infiltrado inflamatorio y edema alveolar (Hong-Liang *et al.*, 2006). Los cambios microscópicos en hígado fueron observados después de 48 horas postinfección, detectándose necrosis y disociación de hepatocitos. En los riñones se observó nefritis intersticial caracterizada por un infiltrado celular compuesto por neutrófilos y monocitos, no se detectaron cambios en los glomérulos; sin embargo, se observaron eritrocitos en el lumen de los túbulos (Hong-Liang *et al.*, 2006). También se observaron petequias y equimosis en el peritoneo y otros órganos internos, como corazón, estómago e intestinos (Hong-Liang *et al.*, 2006).

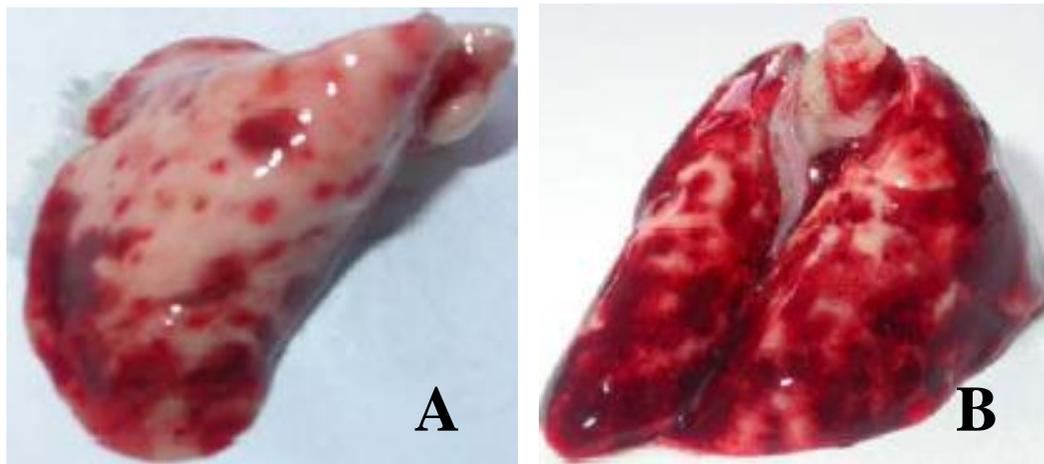


Figura 6: Pulmones de cobayos inoculados con *L. Interrogans* serovariedad Lai. A) 72 h y B) 96 h post infección (Hong-Liang *et al.*, 2006).

## 1.8 BIOLÓGICOS CONTRA *Leptospira* EN HUMANOS

La vacunación para la prevención de la leptospirosis es una práctica común en medicina veterinaria y humana. En la actualidad hay reconocidas más de 260

serovariedades de leptospiras patógenas distribuidas alrededor del mundo, por lo que hay una gran variabilidad en la prevalencia de serovariedades de una zona a otra (serovariedades endémicas). Aunado a esto, la protección producida por los biológicos es específica de la serovariedad con la que están elaborados, lo que complica aún más el desarrollo de un inmunógeno que pueda ser utilizado globalmente (Faine *et al.*, 1999).

Actualmente, hay bacterinas de *Leptospira* (bacterias completas muertas) disponibles para humanos en diferentes países como son Cuba (Martínez *et al.*, 2004), Japón (Nomura *et al.*, 1971), China (Chen, 1986) y Rusia (Iagovkin *et al.*, 1990).

Desde 1952, en Japón ya se usaban bacterinas, éstas contenían microorganismos formalinizados a una concentración de  $2.5 \times 10^8$  leptospiras/ml de las serovariedades Australis, Autumnalis y Hebdomadis y  $5 \times 10^8$  microorganismos/ml de la serovariedad Copenhageni. Este inmunógeno se administra por vía subcutánea en dos dosis (1ml/dosis), con un intervalo de 7 días entre cada una. Los títulos de anticuerpos detectados con la prueba de AM posterior a la inmunización son significativamente más bajos que los detectados después de una infección natural con una seroconversión de entre 20 % a 60%. Sin embargo, la protección y eficacia obtenida con estas bacterinas es de entre 60% a 100% (Kitaoka and Inoue, 1952; Torten *et al.*, 1973; Fukumura, 1984).

En Cuba la leptospirosis es una enfermedad que ha mostrado un comportamiento endémico y epidémico con características epidemiológicas cambiantes, por tal razón, a partir de 1983 se comenzó a aplicar la vacuna anti-*Leptospira* Vaccinum Leptospiriosum (Instituto de Sueros y Vacunas, Stavropol, Rusia), a personas con mayor riesgo de contraer la infección en áreas endémicas, aplicándose por vía subcutánea en dos dosis: la primera de 2 ml y la segunda de 2.5 ml con un intervalo de siete días. Esta vacuna se dejó de aplicar en el año de 1991 cuando se comenzaron estudios para elaborar una vacuna cubana contra la leptospirosis, con las cepas autóctonas de mayor circulación en el país, lo cual dio origen a la vacuna contra la leptospirosis vax-SPIRAL (Instituto Finlay, Cuba) (Martínez *et al.*, 2004). Esta vacuna es una bacterina que contiene entre  $5$  a  $8 \times 10^7$  células de las serovariedades

Canicola, Copenhageni y Mozdok adsorbidas en 1 mg de gel de hidróxido de aluminio en 0.5 ml de solución amortiguadora de fosfatos con 0.05 mg de tiomersal como conservador. Los estudios de eficacia y seguridad realizados en una población humana expuesta al riesgo de infección por residir en una zona con una alta incidencia de leptospirosis, demostraron que este inmunógeno es seguro y eficaz para prevenir la enfermedad en grupos de riesgo, ya que los casos de leptospirosis detectados afectaron fundamentalmente a la población que no había recibido la vacuna contra la leptospirosis (2.38 casos/10,000 habitantes en personas vacunadas frente a 10.89 casos/10,000 habitantes en personas sin vacunar) (Martínez *et al.*, 2004).

### **1.9 BIOLÓGICOS CONTRA *Leptospira* EN ANIMALES**

La vacunación continúa siendo una de las vías más sostenibles y utilizadas en el control de enfermedades infectocontagiosas en medicina veterinaria, debido a su mayor factibilidad económica y por el problema que representa la residualidad de antibióticos en productos animales para consumo humano. Tradicionalmente las estrategias de vacunación ayudaron a erradicar y controlar epidemias en medicina veterinaria, sin embargo las vacunas utilizadas (vacunas inactivadas y atenuadas tienen desventajas como los peligros de inactivación incompleta y reversión de la patogenicidad que producen un número de casos clínicos de las enfermedades después de las vacunaciones. Los avances tecnológicos de las últimas décadas relacionados con la manipulación genética, las técnicas de ADN recombinante, los nuevos métodos de atenuación de patógenos, los progresos en inmunología, particularmente en lo referido a la presentación antigénica y procesamiento de antígenos ha permitido dirigir las vacunas para que generen repuestas inmunes más específicas así como la utilización de nuevos adyuvantes, han servido de base fundamental para las llamadas vacunas de nueva generación.

**BACTERINAS:** En los últimos 50 años se han desarrollado y evaluado bacterinas contra *Leptospira* en diferentes especies animales como bovinos, cerdos, perros, ovejas y caballos, incluyendo animales de laboratorio. La mayoría de estas bacterinas contienen microorganismos inactivados por químicos o calor y la protección es principalmente serovariedad específica, siendo éste el límite de la eficacia de estos preparados. Por tal razón, la vigilancia epidemiológica de las serovariedades de *Leptospira* presentes en una zona o región es necesaria para la correcta incorporación de serovariedades en las bacterinas. Uno de los primeros trabajos realizados demostró una protección parcial en hámsteres inmunizados con cultivos de la serovariedad Canicola inactivados con fenol (Broom, 1949). Posteriormente, se realizaron otros trabajos donde se reportó la inmunización efectiva en hámsteres y perros con una bacteria liofilizada de la serovariedad Canicola o Icterohaemorrhagiae demostrando que sólo protege contra la serovariedad con la que está elaborada, sin presentarse protección cruzada (Brunner and Meyer, 1950). En 1955 Brown y colaboradores reportaron el desarrollo de una bacteria con adyuvante e inactivada con formalina, la cual generó en terneros títulos de anticuerpos más altos en comparación con la bacteria sin adyuvante (Brown *et al.*, 1955). Otro trabajo refiere que bovinos inmunizados con dos bacterinas pentavalentes conteniendo la serovariedad Hardjobovis o Hardjoprajitno fallaron en la protección contra la infección experimental, debido a que los animales eliminaron leptospiras por orina a pesar de haberseles detectado por aglutinación microscópica títulos de anticuerpos altos en suero, concluyendo que la evaluación de la eficacia de una bacteria no debe estar basada únicamente en la serología (Bolin *et al.*, 1989).

Las bacterinas contra *Leptospira* cuando son utilizadas en las especies domésticas, a menudo no inducen niveles significativos de anticuerpos aglutinantes a pesar del uso de adyuvantes, especialmente en los cerdos; aunque se ha descrito el uso de una bacteria comercial bivalente contra Pomona y Canicola que es capaz de proteger contra la infección y prevenir la leptospiruria en esta misma especie (Bey and Johnson, 1983; Hodges *et al.*, 1985). Sin embargo, un trabajo realizado en 1995 demostró que una sola inmunización realizada con una bacteria contra *Leptospira* en

cerdos no induce, después de 15 días, títulos de anticuerpos detectables por aglutinación microscópica en el 96% de los animales y que sólo 15 días después de una segunda inmunización se detectaron títulos de 1:100 por AM (Francois *et al.*, 1995).

También se han desarrollado bacterinas y evaluado los efectos de la revacunación en caballos y terneros con la serovariedad Pomona, observándose una inflamación local en el sitio de la inyección que persistió durante tres o cuatro días (Bramel and Scheidy, 1956).

Las bacterinas elaboradas para perros se encuentran comercialmente desde la década de 1950 y contienen en su formulación las serovariedades Canicola e Icterohaemorrhagiae. Sin embargo, debido a la diversidad antigénica de *Leptospira* los animales no están protegidos contra otras serovariedades no incluidas en las preparaciones comerciales. Se menciona que la inmunidad que se instaura ante la inmunización dura menos de seis meses y aunado a que no se recomienda la vacunación en cachorros menores de 9 o 10 semanas de edad, no se han obtenido buenos resultados en la prevención de la leptospirosis en perros (Hartman, 1984; Hartman *et al.*, 1984).

**VACUNAS VIVAS ATENUADAS:** En 1961 se desarrolló una de las primeras vacunas vivas atenuadas para *Leptospira* utilizando la serovariedad Pomona atenuada por medio de pases sucesivos en embriones de pollo, reportando que en campo generó protección y redujo la incidencia de aborto en bovinos (Kenzy *et al.*, 1961). Existe otro reporte donde se inactivaron leptospirosis de la serovariedad Icterohaemorrhagiae por medio de radiaciones gamma, esta vacuna fue capaz de producir anticuerpos aglutinantes y protección contra la muerte y la infección renal en cobayos (Hubert and Miller, 1965). Sin embargo, otros reportes contradicen estos resultados, donde encontraron que las vacunas irradiadas no fueron más eficaces en la prevención de la muerte o infección renal en comparación con vacunas inactivadas químicamente (Babudieri *et al.*, 1973).

A pesar de que las vacunas vivas atenuadas son capaces de estimular mayores títulos en comparación con bacterinas de *Leptospira* inactivadas químicamente, no han ganado una amplia aceptación, esto se debe probablemente a la dificultad de mantener la viabilidad del microorganismo durante el almacenamiento del biológico, así como la posible reversión al estado virulento en el animal hospedero (Fish and Kingscote, 1973).

**VACUNAS ACELULARES:** También se han elaborado inmunógenos a partir de membranas externas de *Leptospira*, donde los resultados muestran una buena protección contra el desafío y mayores títulos de anticuerpos detectados mediante aglutinación microscópica, en comparación con los inducidos con bacterinas elaboradas con bacterias completas muertas (Yan *et al.*, 2003).

*Leptospira* posee en la superficie de la membrana externa (PME) proteínas que en su totalidad o fraccionadas, son inmunogénicas y conservadas entre las diferentes serovariedades de leptospiras patógenas, por lo que pueden generar protección cruzada contra serovariedades diferentes. Por tal razón, se han convertido en una importante línea de investigación para la formulación de vacunas contra la leptospirosis. Se ha mencionado que extractos de proteínas preparados a partir de leptospiras patógenas pueden inducir una inmunidad protectora contra el desafío con cepas heterólogas en animales de laboratorio. Estos experimentos demuestran el potencial uso de proteínas como candidatas para ser utilizadas en la elaboración de nuevas vacunas que induzcan una buena protección contra diversas serovariedades (Guerreiro *et al.*, 2001; Sonrier *et al.*, 2001).

En un trabajo realizado en 1968 por Anderson y colaboradores, se menciona que hubo acción directa de anticuerpos y complemento sobre los componentes de la membrana externa de *Leptospira*. También sugiere que leptospiras virulentas parecían tener una mayor resistencia a la acción del complemento en comparación con leptospiras no virulentas, proponiendo que las primeras poseían algunos componentes en su superficie que pudieran estar asociados con la virulencia (Anderson and Johnson, 1968). Posteriormente, se realizó en 1972 otro experimento

donde se removió la membrana externa del cilindro protoplasmático de la serovariedad Canicola, subsecuentemente se inmunizaron grupos de hámsteres con las membranas externas y con células completas formalinizadas, 14 días después de la inmunización se desafiaron y se observó que los animales inmunizados con membranas externas o células completas formalinizadas estaban protegidos contra la presentación clínica y muerte y eran resistentes a la colonización renal (Auran *et al.*, 1972).

En 1998, Zhang y colaboradores prepararon una vacuna de una PME hidrofóbica de 39 kDa, que confirió una inmunidad sólida contra el desafío, similar a la observada con bacterinas elaboradas con células completas (Zhang *et al.*, 1998). Sin embargo, también se ha examinado la capacidad inmunoprotectora de otros antígenos proteicos que son reconocidos por anticuerpos producidos durante la infección por *Leptospira* como es la lipoproteína LipL41, esta proteína en combinación con la porina transmembranal OmpL1 (proteínas recombinantes expresadas en *E. coli*) confieren inmunoprotección sinérgica en hámsteres desafiados con la Sv Grippotyphosa. Paradójicamente estas mismas proteínas (OmpL1 y LipL41) no son protectoras cuando se administraron individualmente, siendo éste el primer reporte de protección usando proteínas recombinantes de *Leptospira* (Shang *et al.*, 1995; Haake *et al.*, 1999). Por otro lado, la combinación de OmpL1 con la lipoproteína de membrana externa LipL32 o Hap1, demostró que no tienen capacidad protectora sinérgica, esto en comparación con lo reportado con LipL41 y OmpL1. La lipoproteína LipL32 es la proteína inmunodominante y la más abundante de membrana externa, así mismo también es la más conservada entre varias serovariedades en *Leptospira*. Estudios de inmunohistoquímica demostraron una reactividad intensa contra LipL32 en riñones de hámsteres infectados con la serovariedad Grippotyphosa que resulta consistente con una expresión *in vivo* (Shang *et al.*, 1996; Haake *et al.*, 2000; Branger *et al.*, 2001).

Otras proteínas asociadas a virulencia expuestas en la membrana externa son las proteínas similares a inmunoglobulinas LigA y LigB, que tienen reactividad contra muestras de suero recolectadas de perros y ratas infectados con *Leptospira*, en

contraste con muestras de suero de animales vacunados los cuales no mostraron reactividad, lo que indica que estas proteínas son reguladas durante la infección. En ratones mutantes en el gen *Lps* (C3H/HeJ) deficientes en receptores Toll-Like tipo 4 en macrófagos y linfocitos B, las proteínas Lig brindan inmunidad protectora frente al desafío con la serovariedad Manilae. Los receptores Toll-Like tipo 4 regulan la respuesta innata frente al LPS, por lo que estos animales son altamente susceptibles a infecciones por microorganismos Gram negativos (Matsunaga *et al.*, 2003; Palaniappan *et al.*, 2004; Koizumi and Wetanabe, 2005).

Nuestro grupo, ha estudiado la proteína GspD<sub>L</sub> de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjobovis), la cual es la única proteína del sistema de transporte tipo 2 supuestamente ubicada sobre membrana externa de *Leptospira* y es conservada entre las diferentes serovariedades patógenas. Esta proteína es expresada durante la infección siendo detectada por sueros de perros infectados naturalmente y sueros de hámsteres infectados experimentalmente en el laboratorio, lo que sugiere que GspD<sub>L</sub> es antigénica y se expresa in vivo durante el proceso de infección en animales, como son bovinos, hámsteres y perros (Rodríguez-Reyes, 2007).

Igualmente, se ha utilizado al lipopolisacárido (LPS) para la elaboración de inmunógenos acelulares. En un trabajo realizado en 1974, aislaron LPS de leptospiras designándolo F4, este material fue capaz de proteger a ratones de la muerte administrando solamente una dosis de 50 mg con adyuvante de Freund por animal (Faine *et al.*, 1974). Posteriormente, Adler y colaboradores observaron que antisueros de conejo contra LPS protegían a hámsteres de la infección, sólo si las aglutininas se presentan de forma concomitante, lo que indica que el LPS no puede ser un antígeno protector importante (Adler and Faine, 1978). Esto también fue apoyado por los resultados obtenidos al inmunizar a ganado vacunado con una vacuna pentavalente los cuales fueron vulnerables a la infección por el serotipo Hardjo a pesar de la presencia de altos títulos de anticuerpos anti-LPS (Bolin *et al.*, 1991).

Al contrario de esto, un informe realizado en 2000 indica que el LPS de *L. biflexa* serovar Patoc indujo una protección cruzada en hámsteres cuando estos fueron desafiados con *L. interrogans* serovariedad Manilae (Matsuo *et al.*, 2000). Se ha

reportado que un purificado de LPS de la serovariedad Pyrogenes fue capaz de generar anticuerpos en conejos, responsables de la lisis de leptospiras vivas (Srivastava, 2002).

**VACUNAS DE ADN:** Actualmente, se han utilizado vacunas de ADN contra diferentes enfermedades (Cui, 2005), estas ofrecen varias ventajas: se sabe que estas tienen varias rutas de procesamiento (Ulmer *et al.*, 2006), bajo precio (Babiuk *et al.*, 2000) y son de fácil aplicación (Liu and Ulmer, 2005). En pocos años, la tecnología de las vacunas de ADN ha sido desarrollada, esto se debe en gran medida a la practicidad y ventajas que tienen este tipo de inmunógenos sobre las vacunas tradicionales y aún sobre las vacunas de proteínas recombinantes (Wang *et al.*, 2005; Ebensen *et al.*, 2007). El uso de un constructo de ADN que codifique para proteínas de *Leptospira* es un nuevo y prometedor enfoque para la vacunación contra la leptospirosis. Sorprendentemente, son pocas las vacunas de ADN de *Leptospira* que han sido evaluadas; una vacuna que codifica para la proteína 1 asociada a hemólisis (Hap1) fue probada en gerbos, mostrando una protección parcial contra la infección por cepas patógenas de *Leptospira* (Branger *et al.*, 2005). Otro ejemplo del uso de vacunas de DNA, son las que contienen el gen *flaB2* de la endoflagelina (Dai *et al.*, 2000), así como el motivo CpG, que se encuentra dentro del mismo gen y que se cree que actúa como un adyuvante para vacunas de ADN (You *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2002; Dai *et al.*, 2003). Obviamente, las vacunas de ADN de *Leptospira* necesitan ser investigadas más extensamente y pueden llegar a ser una eficaz solución para la prevención de la leptospirosis.

## **1.10 RESPUESTA INMUNOLÓGICA**

Con el fin de conferir protección contra una enfermedad infecciosa el sistema inmunitario debe ser capaz de reconocer bacterias, productos bacterianos, hongos, parásitos y virus como inmunógenos. El sistema inmunitario reconoce en realidad macromoléculas particulares de un agente infeccioso, particularmente proteínas o

polisacáridos. Las proteínas son los inmunógenos más potentes y los polisacáridos ocupan el segundo lugar. En contraste, los lípidos y ácidos nucleicos de un agente infeccioso casi nunca sirven como inmunógeno, a menos que formen complejos con proteínas o polisacáridos. La inmunidad mediada por células, sólo reconoce como inmunógenos a las proteínas y algunos lípidos y glucolípidos (Rojas-Espinosa, 2006). La inmunogenicidad es la capacidad para inducir una respuesta inmunitaria humoral o celular y esto depende, en parte, de cuatro propiedades del inmunógeno: alteridad, tamaño molecular, composición y complejidad química, así como la capacidad para procesarse y presentarse con una molécula del MHC en la superficie de una célula presentadora de antígeno o una célula propia alterada (Goldsby and Kindt, 2004).

### **1.10.1 INMUNIDAD INNATA**

Las respuestas inmunitarias innatas constituyen la primera línea de defensa contra los agentes patógenos y también son requeridas para iniciar la respuesta inmunitaria adquirida. La respuesta inmunitaria innata frente a una infección es rápida y depende de la capacidad del organismo para reconocer características que se han conservado en los patógenos, este reconocimiento se lleva a cabo por medio de receptores de reconocimiento de patrón (PRR). Estos receptores de la inmunidad innata identifican propiedades conformacionales generales conservadas en especies microbianas (inmunoestimulantes asociados a patógenos) que habitualmente no existen en el huésped. Debido a que reconocen patrones moleculares, estos receptores se conocen como receptores de reconocimiento de patrón (PRR). Los patrones que reconoce este tipo de receptor incluyen combinaciones de azúcares, ciertas proteínas, moléculas particulares que llevan lípidos y algunas características de los ácidos nucleicos (Goldsby and Kindt, 2004). La capacidad de los receptores de reconocimiento de patrón para distinguir entre lo propio y extraño es perfecta, toda vez que el patrón molecular que es el blanco del receptor sólo lo produce el patógeno y nunca el huésped. Algunos de estos receptores se hallan en el torrente sanguíneo y líquidos corporales como proteínas solubles circulantes y otros están presentes en la

membrana de células fagocitarias profesionales como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. Por último, hay receptores que están localizados en la superficie de varios tipos de células del huésped y que activan vías de señalización intracelular en respuesta a la unión de moléculas inmunoestimulantes asociadas a patógenos; así se generan moléculas de señalización extracelular que favorecen la inflamación y que participan en la activación de las respuestas inmunitarias adquiridas (Roitt, 1997; Goldsby and Kindt, 2004).

Ejemplos de receptores de reconocimiento de patrón solubles son la lectina de unión de manosa y la proteína C reactiva, las cuales se unen a la superficie de los microbios y facilitan la lisis mediada por el complemento (vía alterna o vía de la lectina de activación del complemento); la proteína de unión de lipopolisacárido también es un PRR que reconoce y señala una respuesta a los lipopolisacáridos, el cual es un componente de la pared celular externa de bacterias gramnegativas. Los receptores de reconocimiento de patrón que se encuentran en la membrana celular incluyen receptores basureros y los receptores homólogos a Toll (Toll Like Receptor). Los receptores basureros se encuentran en macrófagos y muchos tipos de células dendríticas y participan en la unión e internalización de bacterias grampositivas y gramnegativas, así como en la fagocitosis de células apoptóticas del huésped. Los receptores homólogos a Toll (TLR) son importantes en el reconocimiento de muchos patrones microbianos y las señales transducidas a través de éstos, dan lugar a una activación transcripcional y a la síntesis y secreción de citocinas, que promueven reacciones inflamatorias que llevan macrófagos y neutrófilos a sitios de inflamación. El señalamiento de los TLR también puede tener como resultado la incorporación y activación de macrófagos, células NK y células dendríticas, que son componentes fundamentales en la presentación de antígenos a células T (Roitt, 1997).

Actualmente se conocen 10 TLR y se han determinado las funciones de seis de estos. El TLR2 en colaboración con el TLR6 reconoce peptidoglicanos, cimosanos y lipopéptidos. El TLR5 reconoce la flagelina, que es el componente estructural de los flagelos bacterianos. El TLR3 identifica el ARN de doble filamento que aparece después de una infección por virus ARN. El TLR9 reconoce e inicia una respuesta a

secuencias CpG (citocina no metilada unida a guanina) las cuales son abundantes en microbios. El TLR4 es el receptor fundamental para la mayor parte de los lipopolisacáridos bacterianos, aunque el TLR2 también une algunas variedades de lipopolisacáridos (LPS) (Roitt, 1997; Goldsby and Kindt, 2004). La unión de LPS por cualquiera de estos TLR es compleja e incluye la participación varias proteínas adicionales, en la primera etapa la proteína de unión de lipopolisacárido (LBP, de LPS-binding protein) que se encuentra en el torrente sanguíneo y líquidos tisulares se une al LPS, a continuación el complejo se une al receptor CD14 que está unido a la membrana del macrófago. Este complejo activa al receptor TLR4 que recluta a otra proteína adaptadora MyD88, a partir de este momento el proceso de activación se completa en el citoplasma de la célula, finalmente este proceso activa la transcripción de genes que estimulan las respuestas inmunitarias e inflamatorias (Goldsby and Kindt, 2004).

El sistema de complemento está compuesto por más de 30 proteínas solubles que interaccionan entre ellas, son sintetizadas por el hígado y circulan por la sangre y el medio extracelular. La mayoría de ellas se encuentran inactivas hasta que son estimuladas por una infección. Originalmente se describieron por su capacidad para amplificar y “complementar” la acción de los anticuerpos, aunque algunos de los componentes del complemento también son receptores de reconocimiento de patrón (PRR), siendo activados directamente por inmunoestimulantes asociados a patógenos (Roitt, 1997; Rojas-Espinosa, 2006; Lezama, 2007). Después de la activación inicial, interactúan los diferentes componentes del complemento en una cascada regulada para llevar a cabo varias funciones básicas como son: lisis de células, bacterias y virus; opsonización, que promueve fagocitosis de antígenos particulados; estimulación de células del sistema inmunitario desencadenando reacciones inflamatorias y secreción de moléculas inmunorreguladoras; y depuración de complejos inmunitarios de la circulación (Rojas-Espinosa, 2006; Lezama, 2007).

### 1.10.2 INMUNIDAD ADQUIRIDA HUMORAL

La inmunidad adquirida humoral depende de la presencia en la sangre de glucoproteínas conocidas como anticuerpos o inmunoglobulinas. Estas moléculas son producidas por las células plasmáticas que se desarrollan a partir de los linfocitos B. En la mayoría de los mamíferos superiores se han identificado cinco clases o isotipos diferentes de inmunoglobulinas o anticuerpos, determinadas por las cadenas pesadas, concretamente IgG (gamma  $\gamma$ ), IgA (alfa  $\alpha$ ), IgM (mu  $\mu$ ), IgD (delta  $\delta$ ) e IgE (épsilon  $\epsilon$ ), los isotipos también se diferencian entre sí en cuanto a su tamaño, carga, composición de aminoácidos y contenido de hidratos de carbono (Roitt, 1997).

La función principal de un anticuerpo es unirse a su antígeno. En algunos casos, esta unión provoca un efecto directo, por ejemplo neutralización de toxinas bacterianas o impidiendo la penetración de los virus en las células. Sin embargo, la interacción entre el anticuerpo y el antígeno no suele tener consecuencias a no ser que entren en juego funciones “efectoras” secundarias. Los anticuerpos promueven la opsonización, que es la promoción de la fagocitosis de antígenos por macrófagos y neutrófilos, en la superficie de estas células se encuentran moléculas proteínicas llamadas receptores Fc (FcR), que pueden unir la región constante de moléculas de inmunoglobulinas. La unión de los receptores FcR del fagocito con la región Fc del anticuerpo asociado al antígeno produce una interacción cuyo efecto es la unión del agente patógeno a la membrana del fagocito, este enlace crea una vía de transducción de señales que produce fagocitosis del complejo antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos del isotipo IgM e IgG pueden activar un conjunto de glucoproteínas séricas llamado sistema del complemento, que incluye un grupo de proteínas capaces de perforar membranas celulares con la subsecuente destrucción del patógeno (vía clásica de activación del complemento). En el proceso conocido como citotoxicidad mediado por células dependiente de anticuerpos (CCDA), el anticuerpo actúa como un receptor que permite que las células asesinas naturales (NK) reconozcan y destruyan células del huésped infectadas por virus. Algunos anticuerpos pueden cruzar capas epiteliales hasta las superficies mucosas de las vías respiratorias, digestivas y urogenitales, así

como, a la leche materna, a este proceso se llama transcitosis (Roitt, 1997; Goldsby and Kindt, 2004).

La inmunoglobulina IgG es la más abundante en el suero humano normal, constituyendo el 70-75% de las inmunoglobulinas totales y tiene una vida media de 21 días. Los anticuerpos de esta clase se encuentran ampliamente distribuidos en los compartimentos intra y extravascular, son los predominantes en las respuestas inmunitarias secundarias, pueden activar el complemento y son los únicos que presentan actividad frente a las toxinas. Existen cuatro subclases de esta inmunoglobulina IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>. Las IgG procedentes de la madre confieren inmunidad al neonato. Esto debido a que, en los seres humanos, las moléculas de IgG de todas las subclases son capaces de atravesar la placenta, por lo que el neonato adquiere un alto grado de inmunidad pasiva. En algunas especies, como el cerdo, las inmunoglobulinas maternas solamente son transferidas a sus crías después del parto por medio de la leche, que contiene IgG capaces de ser absorbidas selectivamente en el tracto gastrointestinal (Goldsby and Kindt, 2004; Rojas-Espinosa, 2006).

La inmunoglobulina IgM supone aproximadamente el 10% de las inmunoglobulinas totales, tiene una vida media de 5 días y se encuentra confinada en el espacio intravascular. Es el anticuerpo que aparece en mayor cantidad en las fases tempranas de la respuesta inmunitaria, siendo frecuente su presencia en las respuestas frente a microorganismos infecciosos antigénicamente complejos. También es la primera inmunoglobulina que sintetiza el recién nacido y es activadora del complemento (Rojas-Espinosa, 2006).

La inmunoglobulina IgA constituye el 15-20% de las inmunoglobulinas séricas humanas con una vida media de 6 días, en la mayoría de los mamíferos las IgA séricas son principalmente poliméricas, apareciendo sobretodo en forma de dímeros, existen dos subclases de esta inmunoglobulina IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. Las IgA secretorias son las inmunoglobulinas predominantes en las secreciones seromucosas externas como la saliva, lágrima, calostro, leche y las secreciones traqueobronquiales y genitourinarias, siendo, la producción diaria de IgA secretoria la mayor que la de cualquier otra clase de inmunoglobulina, esto debido a que las superficies mucosas,

son el principal sitio de entrada de la mayor parte de los microorganismos patógenos (Roitt, 1997; Weir and Stewart, 1999).

La inmunoglobulina IgD representa menos del 1% de las inmunoglobulinas plasmáticas totales, pero abunda en las membranas de muchas células B. Aún no se identifica una función biológica efectora de la IgD, esta inmunoglobulina tiene una vida media corta de 3 días, debido a que esta proteína es muy susceptible al ataque proteolítico (Weir and Stewart, 1999; Goldsby and Kindt, 2004).

La inmunoglobulina IgE se une a receptores Fc en las membranas de los basófilos y mastocitos; la interacción de estas inmunoglobulinas unidas a un antígeno induce a los basófilos y células cebadas a llevar sus gránulos a la membrana plasmática y liberar su contenido en un ambiente extracelular, en un proceso que se conoce como degranulación, lo que da lugar a manifestaciones alérgicas como el asma o la fiebre del heno. También sensibiliza a las células de algunas mucosas, como la conjuntiva, nasal y bronquial. Esta inmunoglobulina se asocia en la defensa frente a parásitos. Tiene una vida media de 2 días y está presente en valores muy bajos en el suero (Roitt, 1997; Goldsby and Kindt, 2004).

### **1.10.3 COLABORACIÓN CELULAR EN LA RESPUESTA HUMORAL**

Hay dos tipos de antígenos que inducen respuestas de anticuerpos: los antígenos dependientes de células T ( $T_{dep}$ ) y los antígenos independientes de células T ( $T_{ind}$ ).

Las respuestas inmunitarias frente a la mayoría de los antígenos dependen del reconocimiento de dicho antígeno tanto por parte de las células T como por parte de las células B. Estos antígenos se denominan antígenos dependientes de células T ( $T_{dep}$ ). La respuesta inmunitaria secundaria inducida por los antígenos  $T_{dep}$  se caracteriza por ser mucho más intensa que la primaria y suelen ser de naturaleza IgG con maduración de la afinidad (Weir and Stewart, 1999; Goldsby and Kindt, 2004).

También existe una pequeña cantidad de antígenos que pueden activar a las células B sin que sea precisa la colaboración de las células T, a los que se denomina antígenos independientes de células T ( $T_{ind}$ ). Los antígenos  $T_{ind}$  presentan una serie de

propiedades comunes: todos ellos son grandes polímeros con determinantes antigénicos repetidos especialmente resistentes a la degradación. Muchos antígenos  $T_{ind}$  son productos bacterianos, por ejemplo endotoxinas como el lipopolisacárido (LPS), dextranos y levanos de las paredes bacterianas, así como la flagelina polimerizada de los flagelos. En altas concentraciones, muchos de estos antígenos  $T_{ind}$  son capaces de activar clones de células B específicos de otros antígenos, fenómeno que se denomina activación policlonal de las células B; sin embargo, a bajas concentraciones sólo son capaces de activar las células B específicas de ellos mismos. La respuesta primaria de anticuerpos frente a los antígenos  $T_{ind}$  suelen ser algo más débiles que las que se observan frente a los antígenos  $T_{dep}$ , alcanzan su intensidad máxima algo más rápido, son fundamentalmente de tipo IgM y de corta duración, así mismo, la respuesta secundaria es muy parecida a las respuesta primaria y no inducen maduración de la afinidad (Weir and Stewart, 1999; Goldsby and Kindt, 2004).

En general, tras una primera exposición a un antígeno, existe una fase de latencia en la que no es posible detectar la presencia de anticuerpos. A continuación se producen una serie de fases en las que los títulos de anticuerpos aumentan de forma logarítmica hasta estabilizarse en un máximo, y luego comienza a disminuir. Esta disminución es debida al catabolismo natural de los anticuerpos o a su unión al antígeno, con la consiguiente eliminación de la circulación (Stites *et al.*, 1996; Weir and Stewart, 1999).

Examinando las respuestas primaria y secundaria, se observa que difieren principalmente en cuatro aspectos.

A) Curso temporal: La fase de latencia de las respuestas secundarias es más corta, y las fases de meseta y de disminución del título de anticuerpos son de mayor duración.

B) Título de anticuerpos: Las concentraciones máximas de anticuerpos en las respuestas secundarias son mucho mayores (generalmente diez o más veces superiores) que en las respuestas primarias.

C) Isotipo de anticuerpo: En las respuestas primarias los anticuerpos más abundantes son del isotipo IgM, mientras que en las respuestas secundarias son principalmente del isotipo IgG, con cantidades muy pequeñas de IgM.

D) Afinidad de anticuerpos: La afinidad de los anticuerpos suele ser mucho mayor en las respuestas secundarias. Esto es debido a que los anticuerpos producidos en una respuesta secundaria frente a un antígeno dependiente de células T presentan una afinidad media superior a los producidos en el curso de una respuesta primaria. Este fenómeno está relacionado con la conmutación entre IgM e IgG, ya que en las respuestas IgM no se observa una maduración de la afinidad (Stites *et al.*, 1996; Weir and Stewart, 1999).

#### **1.10.4 MEMORIA INMUNITARIA**

El encuentro inicial de un linfocito virgen con capacidad inmunitaria con un antígeno induce una respuesta primaria; un contacto posterior del huésped con el mismo antígeno causa una respuesta secundaria más rápida e intensa. La población amplificada de células de memoria explica la rapidez e intensidad que distingue a una reacción secundaria de la primaria (Roitt, 1997; Goldsby and Kindt, 2004).

En la rama humoral del sistema inmunitario, el antígeno da lugar a la proliferación clonal de linfocitos B en células plasmáticas que secretan anticuerpos y células B de memoria. La respuesta primaria tarda alrededor de cinco a siete días antes que comiencen a aumentar las concentraciones de anticuerpos. Este retraso es el tiempo requerido para la activación de las células B vírgenes por el antígeno y células T cooperadoras ( $T_H$ ) y para la proliferación y diferenciación subsecuentes de las células B activadas en células plasmáticas. Las concentraciones de anticuerpos alcanzan su punto máximo en la respuesta primaria alrededor de los 14 días y a continuación comienzan a decrecer a medida que las células plasmáticas mueren. En la reacción secundaria, el retraso es mucho más corto (sólo uno a dos días), las concentraciones de anticuerpos son mucho más altas y se sostienen por mucho más tiempo. La respuesta secundaria refleja la actividad de la población de células B de memoria

expandida en sentido clonal. Estas células de memoria responden al antígeno con más rapidez que las células B vírgenes; además, debido a que existen muchas más células de memoria que células B vírgenes para la respuesta secundaria se generan más células plasmáticas; por consiguiente, las concentraciones de anticuerpos son de 100 a 1000 veces más altas (Roitt, 1997; Goldsby and Kindt, 2004).

### **1.11 RESPUESTA INMUNOLÓGICA CONTRA *Leptospira***

La respuesta inmune que monta el organismo contra la infección por *Leptospira* es casi completamente mediada por células B, tanto en la infección inicial como en la respuesta inmediata a la reinfección (Adler and Faine, 1977; Adler *et al.*, 1980).

Después de la infección se produce una elevación de anticuerpos IgM, estos alcanzan niveles detectables a los pocos días de la desaparición del periodo febril (fase de bacteremia), aproximadamente de dos a cinco días después de la aparición de los signos de la enfermedad aguda (Thiermann, 1984; Heath and Johnson, 1994) y consiguen su pico máximo alrededor de las 3 o 4 semanas postinfección (Ellis and Michna, 1974; Smith *et al.*, 1994). Los anticuerpos IgM opsonizan al microorganismo por lo que se facilita e intensifica la fagocitosis por parte de los fagocitos resultando en la rápida eliminación de *Leptospira* del torrente sanguíneo, sin embargo, esta puede persistir en sitios inmunológicamente privilegiados (túbulos contorneados renales, humor acuoso) después de que los fagocitos las han eliminado de otros sitios (Faine, 1988; Heath and Johnson, 1994). Las leptospiras patógenas son resistentes a la actividad bactericida del suero normal y en ausencia de anticuerpos específicos no es fagocitada ni destruida por los polimorfonucleares o macrófagos, se ha demostrado que *Leptospira* adquiere reguladores de activación del complemento de la fase líquida del hospedero como es el factor H y la proteína de unión a C4b (C4bBP), el factor H es una proteína soluble que inhibe la vía alterna del complemento bloqueando la formación de la convertasa C3 por unión de C3b y desplazamiento de Bb (Meri *et al.*, 2005). La proteína de unión a C4b (C4bBP) también es una proteína soluble que inhibe la vía clásica y la vía de la lectina

bloqueando la formación de la convertasa C3 ya que se une a C4b y evita su vinculación con C2a (Barbosa *et al.*, 2009).

La resistencia del individuo a la reinfección depende de anticuerpos IgG que van dirigidos contra antígenos serovariedad o serogrupo específicos y se estima que las IgG específicas pueden persistir hasta por 20 años o más (Jost *et al.*, 1989). Por tal razón, cuando se presentan infecciones subsecuentes, éstas suceden generalmente por una serovariedad distinta.

En bovinos, se ha observado que la inmunidad humoral es insuficiente para evitar la infección, una bacterina elaborada contra la serovariedad Hardjo indujo fuertes respuestas proliferativas antígeno específicas por células periféricas mononucleares de tipo Th1 e impidió la infección (Naiman *et al.*, 2001), en contraste con bacterinas tradicionales las cuales sólo indujeron la producción de anticuerpos y fueron incapaces de evitar la infección con una serovariedad específica. Estos resultados sugieren que esta bacterina indujo una respuesta inmune de tipo celular asociada con la protección, en contraste con lo que sucede en hámsteres en los cuales la inmunidad protectora contra leptospirosis es primariamente de tipo humoral.

## **1.12 ADYUVANTES**

Los adyuvantes son sustancias o preparados químicos heterogéneos que, asociados con los antígenos vacunales o inyectados simultáneamente con él, inducen una respuesta inmune más potente y prolongada. Con su empleo se logra una economía de antígeno y de tiempo, así como un mayor nivel de anticuerpos específicos (Morris *et al.*, 1999).

El mecanismo de acción de los adyuvantes ha sido objeto de numerosos estudios y existen diversos factores que explican su modo de acción, pudiendo actuar directamente sobre el sistema inmunitario, o indirectamente, prolongando la persistencia del antígeno vacunal en el organismo. El antígeno libre normalmente difunde con mucha rapidez desde los tejidos locales que rodean el sitio de inoculación, y una de sus funciones importantes es crear un reservorio o depósito del

antígeno de larga vida, pero, en general, éstos funcionan mejor si facilitan la liberación simultánea del antígeno y de sustancias inmunomoduladoras al tejido linfóide (Bennet *et al.*, 1992). Las investigaciones realizadas han demostrado que virtualmente todos los adyuvantes activan o estimulan los macrófagos; éstos cuando son activados estimulan la respuesta inmune por un incremento de la cantidad de antígeno expresado en la membrana celular y de la eficiencia de su presentación a los linfocitos. El macrófago también libera citocinas, que amplifican la proliferación de los linfocitos, sin embargo, sólo algunos adyuvantes poseen la capacidad de actuar específicamente sobre los linfocitos (Guerrero and Gattas, 1982; Wagnerová and Ferencík, 1993).

Los adyuvantes más ampliamente utilizados en las vacunas veterinarias son las emulsiones de aceite mineral (aceite en agua o agua en aceite) y los adsorbentes (hidróxido y fosfato de aluminio). En algunos casos, se emplean liposomas, saponinas, vitamina E, complejos inmunoestimulantes, así como diferentes emulsiones de aceites de origen vegetal o animal. Las emulsiones de aceite mineral, especialmente las del tipo agua en aceite, si bien inducen una fuerte respuesta inmune, pueden provocar riesgos y efectos no deseados, a causa posiblemente de su limitada biodegradabilidad y biocompatibilidad (Straw *et al.*, 1985). Adyuvantes formulados con sulfolipopolisacáridos sintéticos, con características hidrofóbicas, incorporados a una emulsión de escualeno en agua, han sido validados exitosamente en animales de laboratorio con antígenos proteicos y virales, resultando al menos, tan efectivo como los adyuvantes basados en aceite mineral y que actualmente son empleados en diversas vacunas para uso veterinario (Hilgers *et al.*, 1994).

El hidróxido de aluminio (oxihidróxido de aluminio) es uno de los adyuvantes aprobados para el uso humano, este adyuvante tiene un punto isoeléctrico de 11.1 y, por tanto, está cargado positivamente bajo condiciones biológicas, por lo que puede adsorber proteínas cargadas negativamente y adsorber débilmente las proteínas básicas, por lo tanto, el grado de adsorción depende de la naturaleza y concentración del antígeno, de la presencia de sales e iones bufferantes y del pH de la mezcla resultante. Las fuerzas de atracción electrostáticas y las interacciones hidrofóbicas

son las responsables de la adsorción de los antígenos a los adyuvantes que contienen aluminio, pero probablemente las fuerzas de Van der Waals y los enlaces de hidrógenos también contribuyan a la adsorción en estos sistemas (Al-Shakshir *et al.*, 1995).

El hidróxido de aluminio tiene una morfología en fibras lo que le proporciona una gran superficie, dato clave para la adsorción de los antígenos, se disuelve bien en pH ácido y básico, pero no en pH 7.4. Se menciona que este adyuvante causa una inflamación que atrae gran cantidad de células presentadoras de antígeno (CPA) y que los antígenos unidos al aluminio muestran una presencia particulada, en lugar de soluble, con ello son fagocitados por los macrófagos mediante pinocitosis, por lo que pasan al citoplasma y probablemente en estas circunstancias induzcan una respuesta inmunitaria más intensa que frente a antígenos solubilizados. Según las regulaciones de la FDA, son permisibles cantidades no mayores de 0.85 mg de aluminio por dosis de vacuna (May *et al.*, 1984); sin embargo, se ha señalado que el alumbre puede inducir anticuerpos de la clase IgE, así como reacciones alérgicas (Veien *et al.*, 1986). La actividad biológica del hidróxido de aluminio se puede resumir en tres puntos: a) formación de depósitos de antígeno en los tejidos produciendo exposición prolongada, b) producción de antígenos particulados facilitando la presentación de antígeno y c) activación del complemento y estimulación de macrófagos induciendo retención y activación de linfocitos. Estos adyuvantes son efectivos potencializando la respuesta de anticuerpos contra antígenos proteicos, por lo que inducen una respuesta inmune de tipo Th2 y no son efectivos para inducir inmunidad mediada por células (Th1) o por antígenos peptídicos (Hunter, 2002).

Los lipopolisacáridos (LPS) son potentes mitógenos de linfocitos B y también inductores de la producción de IFN gamma por los linfocitos T. Johnson y colaboradores en 1956, descubrieron el efecto adyuvante del LPS de las bacterias gram negativas, lo que abrió la puerta a diferentes técnicas para detoxificar LPS y poder añadirlo a las vacunas (Johnson *et al.*, 1956; Hunter, 2002).

## 2 JUSTIFICACIÓN

Los cambios climatológicos de los últimos años han favorecido la inclusión de la leptospirosis como una de las enfermedades zoonóticas llamadas re-emergentes. También está asociada a riesgos ocupacionales, en particular bajo condiciones higiénico-sanitarias desfavorables, donde tienen un papel preponderante los roedores como reservorios y algunos animales domésticos como los bovinos, cerdos, perros y equinos, que pudieran ser portadores asintomáticos. Esfuerzos para prevenir la leptospirosis en diferentes especies animales se han basado, desde mediados del siglo pasado, en el uso de bacterinas las cuales, son suspensiones de SVs de *Leptospira* inactivadas, actualmente hay disponibles una gran variedad de bacterinas en el mercado.

El criterio de selección de las SVs que constituyen la formulación de las bacterinas contra la leptospirosis está basado en la región geográfica y en la especie animal por inmunizar (prevalencias conocidas en determinada especie). Por ejemplo, para perros las serovariedades más comunes incluyen: Canicola, Grippotyphosa, Pyrogenes e Icterohaemorrhagiae; para cerdos: Pomona, Bratislava y Canicola; mientras que para bovinos son las serovariedades: Hardjo, Pomona y Tarassovi. No existe protección cruzada entre serovariedades y la inmunización sólo protege contra aquellas que contiene y otras antigénicamente similares, debido a la gran diversidad antigénica que se presenta por las variaciones en la estructura y composición del LPS.

La inmunodominancia del LPS como antígeno determina que las bacterinas actualmente disponibles induzcan mayormente una inmunidad humoral dirigida a epítopes polisacáridicos específicos de serogrupo o serovariedad. La presencia de las serovariedades de *Leptospira* cambia de una zona geográfica a otra, por lo que la bacterina no garantiza la protección contra las serovariedades presentes en diferentes zonas geográficas. Sumado a esto, las bacterinas no evitan el desarrollo del estado de portador con la subsecuente eliminación del microorganismo por la orina (Schreiber *et al.*, 2005; Srivastava, 2006).

Finalmente, en la formulación se utilizan generalmente serovariedades de referencia que no necesariamente garantizan la inclusión de antígenos específicos de las serovariedades presentes en una región en una especie animal determinada. La elaboración de biológicos utilizando cepas autóctonas pudiera representar una forma científicamente fundamentada para su inclusión en la formulación de los biológicos específicos.

La serovariedad Canicola es la más importante en perros y su presencia ha sido demostrada en México, por lo tanto, en el presente trabajo se compara la protección de inmunógenos elaborados con la cepa patógena de *Leptospira* de probada virulencia en hámster, aislada a partir de tejido renal de perros en la ciudad de México y caracterizada mediante tipificación por secuenciación de locus múltiples (MLST), como *Leptospira interrogans*, serovariedad Canicola, cepa LOCaS46, así como de una variante no virulenta y una cepa de referencia, *L. interrogans* serovariedad Canicola cepa Hond Utrecht IV.

,

### **3 HIPÓTESIS**

Las bacterinas elaboradas a partir de un aislado virulento de la serovariedad Canicola cepa LOCaS46 producirán una mayor respuesta inmune humoral y protectora en el modelo animal hámster en comparación con una bacterina elaborada con la serovariedad Canicola, cepa de referencia Hond Utrecht IV.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Comparar la producción de anticuerpos del isotipo IgM e IgG y la protección contra el desafío inducidos por cuatro bacterinas elaboradas con *Leptospira interrogans*, serovariedad Canicola, cepa LOCaS46 y cepa Hond Utrecht IV de referencia.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la dosis letal 50% (DL50%) para *Leptospira interrogans*, serovariedad Canicola, cepa LOCaS46.
- Desarrollar inmunógenos a partir de *Leptospira interrogans*, serovariedad Canicola, cepa LOCaS46: CL46-I (cepa LOCaS46 alto pasaje), CL46-V (cepa LOCaS46 bajo pasaje) y CL46-VA (cepa LOCaS46 bajo pasaje con adyuvante), así como, de *L. interrogans*, serovariedad Canicola, cepa Hond Utrecht IV: CHU-VI
- Realizar las pruebas de esterilidad, inocuidad y potencia de las bacterinas elaboradas.
- Cuantificar la respuesta inmune humoral primaria (IgM) y la respuesta inmune humoral secundaria (IgG) en el modelo hámster mediante las técnicas de aglutinación microscópica (AM) y ELISA.
- Evaluar la capacidad protectora contra la enfermedad y el estado de portador renal, mediante la inoculación de 200 dosis letales 50% (DL50) de la serovariedad Canicola, cepa LOCaS46 virulenta en hámsteres previamente inmunizados (prueba de potencia).

## **5 MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1 ANIMALES**

Para el establecimiento de la dosis letal 50% (DL50) se utilizaron como modelo experimental 32 hámsteres, sirio dorado (*Mesocricetus auratus*), de 13 semanas de edad.

Para realizar la prueba de potencia, en el primero y segundo ensayos se utilizaron 60 y 34 hámsteres respectivamente, de 8 semanas de edad (adulto joven).

Para realizar la prueba de inocuidad de los biológicos elaborados, se utilizaron 8 cobayos de la estirpe Hartley (*Cavia porcellus*), con un peso entre 250 a 300 g (dos animales por cada bacterina a probar). Tanto los hámsteres como los cobayos fueron mantenidos bajo condiciones de aislamiento con cama convencional de viruta de madera, alimento y agua *ad libitum*, como marcan las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

### **5.2 CEPAS BACTERIANAS**

Para la producción de la Bacterina CHU-IV se utilizó la serovariedad Canicola de *Leptospira interrogans*, cepa de referencia Hond Utrecht IV. Esta cepa ha perdido virulencia, no es capaz de infectar ni tampoco es capaz colonizar los riñones, por lo que no puede ser reaislada de los animales inoculados.

Para la producción de la Bacterina CL46-I (alto pasaje), se utilizó la serovariedad Canicola de *Leptospira interrogans*, serogrupo Canicola, cepa LOCaS46 atenuada mediante repetidos pases en medio de cultivo Fletcher (23 pases con un intervalo de 3 meses entre cada uno), la cual no produce la muerte de hámsteres desafiados. Sin embargo, el microorganismo es capaz de colonizar los riñones de los animales y es eliminado por la orina, muestras de las que puede ser reaislado.

Para la producción de las Bacterinas CL46-V (bajo pasaje) y CL46-VA (bajo pasaje) con adyuvante (hidróxido de aluminio), se utilizó la serovariedad Canicola de *Leptospira interrogans*, cepa LOCaS46 de probada virulencia en hámsteres, la cual produce la muerte en un promedio de 6 días postinoculación. La virulencia de esta cepa fue mantenida por medio de pases continuos en hámsteres y preservada en medio semisólido Fletcher (Castillo-Sánchez, 2008).

### **5.3 CÁLCULO DE LA DOSIS LETAL 50% (DL50)**

Se estableció la DL50 de la cepa LOCaS46 serovariedad Canicola de *Leptospira interrogans*, proveniente de cultivos de un riñón de perro naturalmente infectado con el microorganismo y de probada virulencia (Castillo-Sánchez, 2008).

Para preparar la semilla usada para la infección, se inoculó un hámster por vía intraperitoneal (IP) con leptospiras virulentas de la cepa LOCaS46, posteriormente se recuperó al microorganismo en medio EMJH líquido a partir de muestras de sangre, orina, riñón e hígado del animal infectado. Los cultivos se incubaron durante 10 días a 30 °C (Precision Scientific Co. Thelco ®), el desarrollo y viabilidad se verificaron por medio de observación microscópica de campo oscuro (CO) (Karl Zeiss ®), finalmente los cultivos (pase cero) se usaron para inocular a los hámsteres para el cálculo de la DL50. El conteo de leptospiras para el inóculo se realizó en una cámara de Petroff Hausser (HAUSSER SCIENTIFIC ®). Posteriormente, se realizaron diluciones del cultivo virulento (cepa LOCaS46) en medio EMJH líquido, a fin de obtener una concentración de leptospiras de 100, 10, 5 y 1 /microorganismos/0.5 ml. Los hámsteres se inocularon por vía intraperitoneal (IP) con 0.5 ml de la dilución, previa desinfección de la región abdominal con etanol al 70% y se observaron diariamente durante 18 días después del desafío, registrándose las muertes ocurridas por día. A los animales que sobrevivieron a la infección se les aplicó la eutanasia después del día 18 post-inoculación sangrándolos en blanco por punción cardiaca, previa anestesia con pentobarbital sódico (70 mg/kg) por vía IP (Figura 7A, B, C y D).

Se formaron cuatro grupos, cada uno con 8 hámsteres (*Mesocricetus auratus*). En el Cuadro 1 se muestra la distribución de especímenes por grupo, así como el número de microorganismos inoculados por animal por grupo.

CUADRO 1: DISTRIBUCIÓN DE HÁMSTERES (*Mesocricetus auratus*) POR GRUPO PARA CALCULAR LA DL50

GRUPO	1	2	3	4
NÚMERO DE ANIMALES	8	8	8	8
DILUCIÓN	-5.25	-6.25	-6.75	-7.25
CANTIDAD DE LEPTOSPIRAS INOCULADAS (0.5 ML/IP)	100	10	5	1

La DL50 se define como la cantidad mínima de microorganismos que al administrarse por la vía apropiada a un número determinado de animales susceptibles, provoca la muerte de la mitad de estos (50%), al término de un período determinado. La DL50 se calculó mediante el método descrito por Reed y Muench (Reed and Muench, 1938).

### 5.3.1 COLECCIÓN DE MUESTRAS

Tanto de los hámsteres que murieron como de los que sobrevivieron a la infección experimental, se colectaron muestras de sangre, orina, riñón e hígado.

La sangre se obtuvo por punción cardíaca con una jeringa de 3 ml (21G x 32mm), previa descontaminación de la región torácica con etanol al 70%. La sangre colectada se mantuvo a temperatura ambiente durante 3 a 4 horas hasta que se formó el coágulo

posteriormente en condiciones de esterilidad, se colectó el suero en microtubos de plástico de 1.5 ml y se centrifugó a 3,000 xg (centrifuga refrigerada Savant, modelo SF13K) durante 10 min con el fin de separar completamente el suero del paquete celular. El suero ya separado, se colocó en microtubos nuevos, se rotuló y se congeló a -20°C hasta el momento de realizar la prueba de AM (Figura 7D).

Para la colección de orina y órganos, se realizó una incisión longitudinal por línea media en la región abdominal previa descontaminación con etanol al 70% y se expuso la vejiga, obteniéndose la orina por punción vesical con una jeringa de insulina estéril (Figura 7E). La orina se utilizó para la observación microscópica por CO (x1,200) y para su cultivo en medio Fletcher.

Una vez expuesta la cavidad abdominal se extirpó un riñón y se retiró una porción de hígado con unas tijeras de disección y unas pinzas con dientes de ratón previamente flameadas con etanol al 96%. Los órganos se colocaron por separado en el interior de una jeringa de 10 ml (después de haber retirado el émbolo), se colocó nuevamente el émbolo y se expulsó a través de la aguja (21G x 32mm), con la finalidad de obtener un macerado y utilizarlo inmediatamente para el cultivo bacteriológico y para la detección de ADN de *Leptospira* mediante la técnica de PCR.

### **5.3.2 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS**

#### **5.3.2.1 ESTUDIO BACTERIOLÓGICO**

**MICROSCOPIA DE CO:** Se realizó de las muestras de orina y sangre, así como de los macerados de tejido renal y hepático diluyéndolas en una gota de medio EMJH líquido sobre un portaobjetos para facilitar la observación de las mismas.

**CULTIVO BACTERIOLÓGICO:** El aislamiento de leptospiras a partir de muestras clínicas se efectuó de las muestras de orina, riñón, hígado y sangre de los hámsteres inoculados. Un volumen de 50 a 200 µl de orina o sangre se inocularon directamente de la jeringa a tubos con 5 ml de medio Fletcher semisólido (Myers, 1985). Dos diluciones decimales se realizaron en medio Fletcher semisólido a partir

del primer tubo. El inóculo de los órganos se realizó a partir del macerado de hígado o de riñón obtenidos previamente. Se depositaron 1 a 2 gotas del macerado directamente en el medio de cultivo Fletcher semisólido, posteriormente también se realizaron dos diluciones decimales de cada tubo. Los cultivos primarios y sus diluciones, se incubaron en una estufa bacteriológica a 30°C durante tres meses revisando periódicamente en un microscopio de CO con la finalidad de detectar desarrollo bacteriano.

### **5.3.2.2 ESTUDIO SEROLÓGICO: AGLUTINACIÓN MICROSCÓPICA (AM)**

De los animales que fue posible recuperar una muestra de sangre se realizó la prueba de AM a partir de una dilución 1:10 del suero y usando la serovariedad Canicola, cepa de referencia Hond Utrecht IV de *Leptospira interrogans*, que fue cultivada en 5 ml de medio EMJH líquido a una temperatura de 30 °C. Los cultivos se revisaron cada dos días para comprobar el desarrollo macroscópico y se sembraron cada siete días en condiciones de esterilidad transfiriendo un volumen de 0.5 ml del cultivo desarrollado al medio de cultivo fresco. Se trabajó con aquellos cultivos que tuvieron un desarrollo igual a la turbidez de 0.5 en la escala de MacFarland (entre 150-200 leptospiras por campo) y que no formaran “nidos” de leptospiras (autoaglutinación). La prueba se realizó en dos fases: A) Prueba tamiz que se utilizó para detectar los sueros positivos y poder hacer una selección previa eliminando los negativos y posteriormente, B) Extensión de las diluciones en aquellos sueros que fueron positivos en la prueba tamiz contra alguna serovariedad.

El resultado de la prueba se reportó como la última dilución que aglutinó el 50 % de leptospiras y se consideró negativa o sin aglutinación, cuando la muestra de suero se observó igual al antígeno control (Cuadro 2). La prueba de AM se realizó en microplacas plásticas de 96 pozos de fondo plano y la dilución del suero problema (1:10) se preparó con solución amortiguada de fosfatos (SAF) en tubos de plástico de 1.5 ml (Myers, 1985).

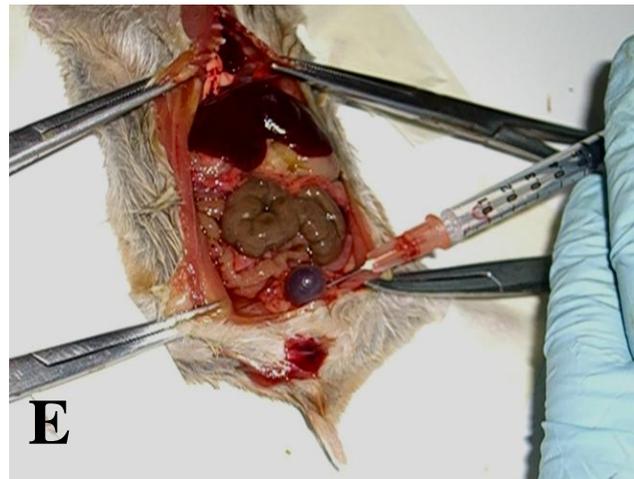
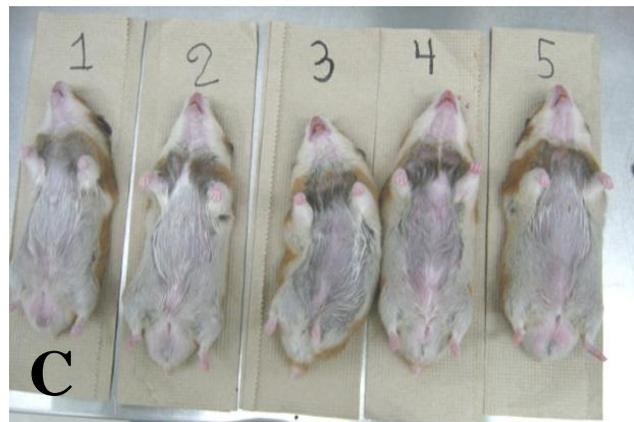


Figura 7: Eutanasia de hámsteres y colección de muestras. A y B) Pesaje de hámsteres y aplicación de pentobarbital sódico (70 mg/kg) por vía IP. C) Hámsteres anestesiados. D) Sangrado en blanco por punción cardíaca. E) Incisión por línea media y colección de muestra de orina por punción vesical.

CUADRO 2: INTERPRETACIÓN PARA LA PRUEBA DE AGLUTINACIÓN MICROSCÓPICA

AGLUTINACIÓN	OBSERVACIÓN	INTERPRETACIÓN
1	Aglutinación con 75% de células libres	<b>NEGATIVO</b>
2	Aglutinación con 50% de células libres	<b>POSITIVO</b>
3	Aglutinación con 25% de células libres	
4	Aglutinación con 0 – 25% de células libres	

### 5.3.2.3 ESTUDIO MOLECULAR: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

**EXTRACCIÓN DE ADN:** Las muestras de riñón e hígado de hámster fueron procesadas para la extracción de ADN con el sistema comercial Quiagen (QIAamp DNA Mini Kit®) siguiendo el protocolo de extracción del fabricante. Se pesó una muestra de 25 mg de tejido (Balanza granataria Denver Instruments, XE-310), depositándolo en un microtubo de plástico, se agregaron 180 µl de buffer ATL® y 20 µl de PROTEINASA K®; la mezcla se homogeneizó en un agitador (Thermo Line), durante 3 min y se incubó en baño María a 55 °C durante 12 hrs homogenizando frecuentemente hasta que el tejido estuvo completamente lisado (no más de 16 hrs). Una vez lisado el tejido se retiró el tubo del baño María y se homogenizó durante 15 seg (Thermo Line), a continuación se agregaron 200 µl de buffer AL® y se homogenizó nuevamente durante 1 min. Posteriormente, se incubó a 70 °C durante 10 min en un bloque de incubación (Fisher Scientific®). Se agregaron 200 µl de etanol al 100% y se mezcló suavemente. Se transfirió la mezcla obtenida del paso anterior a la columna de extracción del sistema y se colocó en un tubo de colección de 2 ml y se centrifugó a 6,000 xg durante 1 min. Se cambió la columna a otro tubo de colección, se agregaron 500 µl de Buffer AW1® y se centrifugó a 6,000 xg durante 1 min. Se transfirió nuevamente la columna a otro tubo de colección y se agregaron 500 µl de

Buffer AW2® y se centrifugó 10,500 xg durante 3 min. Se colocó la columna en un microtubo de plástico nuevo con capacidad de 1.5 ml y se agregaron 200 µl de Buffer de elusión AE® a la membrana de la columna, se incubó a temperatura ambiente durante 1 min. Finalmente, para colectar el extracto de ADN se centrifugó a 6,000 xg por 1 min se retiró la columna del tubo y se congeló hasta su uso en la técnica de PCR.

**REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR):** La técnica de PCR se empleó como prueba paralela al cultivo para la detección de leptospiras patógenas en las muestras clínicas. Se utilizó el par de iniciadores GI/GII que amplifican fragmentos de ADN de 285 pb del gen *secY*, que codifica para una preproteína del Sistema general de secreción a partir de seis especies de leptospiras patógenas: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. weillii*, *L. noguchii*, *L. santarosai* y *L. meyeri* (Gravekamp *et al.*, 1993). Los iniciadores GI/GII fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis de oligonucleótidos y secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT) (Cuadro 3).

CUADRO 3: SECUENCIAS DE INICIADORES UTILIZADOS EN LA PCR Y SU POSICIÓN EN EL GENOMA DE *Leptospira interrogans* SEROVARIEDAD LAI

INICIADOR	COMPOSICIÓN NUCLEOTIDICA 5'-3' (ORIENTACIÓN)	REGIÓN SOBRE LA QUE AMPLIFICA	POSICIÓN EN EL GENOMA*	FRAGMENTO AMPLIFICADO (pb)
GI	CTGAATCGCTGTATAAAAGT (a)	Cromosoma I Gen <i>secY</i>	772349-772368	285 pb
GII	GGAAAACAAATGGTCGGAAG (r)		772084-772103	

(a = adelantado; r = reverso) \*Número del GeneBank

La solución de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dTTP, Roche ®) fue preparada a una concentración de 10 mM cada uno, se empleó FastStart Taq DNA Polymerase (Roche ®) (5 U/μl). Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 μl. Se utilizó ADN genómico de la cepa LOCaS46 como control positivo (Cuadro 4). Las condiciones de temperatura y tiempo de las fases de desnaturalización, alineación y extensión para la PCR se detallan en la Figura 8. Se utilizó un termociclador marca Perkin Elmer ® (GeneAmp PCR System 2400).

CUADRO 4: MEZCLA DE REACTIVOS PARA PCR

REACTIVO POR MUESTRA	
dNTPs (10 mM)	1 μl
Oligonucleótido GI (10 pM)	1 μl
Oligonucleótido GII (10 pM)	1 μl
Buffer MgCl 50X	3 μl
DNA Taq Polimerasa	0.250 μl
ADN muestra o control positivo	5 μl
Agua desionizada estéril	13.750 μl
VOLUMEN FINAL DE LA REACCIÓN	25 μl

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR fueron separados por peso molecular mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% con buffer de corrimiento TAE 1X (Tris-Acido acético-EDTA pH 8) y teñidos con bromuro de etidio (DIFCO ®) a una concentración de 0.1μg/μl. Se utilizó azul de bromofenol y xilencianol como colorante de carga y marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder 250 μg (1.0 μg/ μl) (Invitrogen®). Para visualizar los fragmentos de ADN teñidos con bromuro de etidio, se utilizó un transiluminador (FOTO/PRER BY FOTODYNE ®).

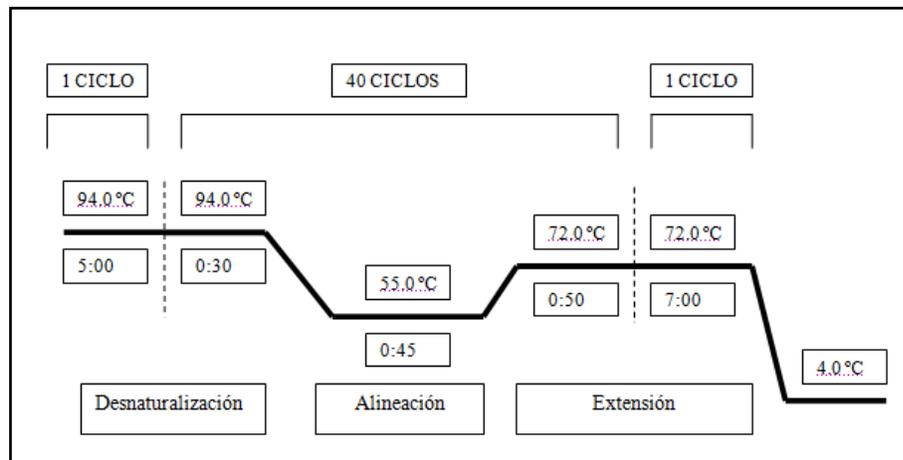


Figura 8: Condiciones de temperatura y tiempo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

## 5.4 FORMULACIÓN DE BACTERINAS

### 5.4.1 MEDIO Y MÉTODO DE CULTIVO

Para cultivar las diferentes cepas de *Leptospira* se utilizaron 200 ml de medio líquido EMJH distribuido en frascos. Los 200 ml de medio EMJH fueron inoculados con 10 ml de cultivo de leptospiras viables desarrollada también en medio EMJH. El cultivo se incubó a 30°C en una estufa bacteriológica durante 15 días o hasta que alcanzó por lo menos una densidad de  $2.4 \times 10^8$  microorganismos/ml. La viabilidad y densidad del cultivo se supervisaron mediante la observación microscópica por CO y por el conteo de leptospiras en una cámara de Petroff-Häusser (HAUSSER SCIENTIFIC®).

Previo a la inoculación del cultivo, la semilla de *Leptospira* también fue evaluada por microscopía de CO y se utilizó cuando esta alcanzó una turbidez de 0.5 en la escala de McFarland.

### 5.4.2 PRUEBA DE ESTERILIDAD

Una vez que el cultivo alcanzó la concentración de microorganismos deseada se realizó la prueba de esterilidad inoculando 0.5 ml del cultivo directamente en los

medios de agar sangre, caldo tioglicolato y agar Sabouraud, estos fueron incubados durante 21 días en una estufa bacteriológica a 37 °C revisando diariamente. Del mismo modo se realizó la prueba de esterilidad a la semilla de *Leptospira* usada para inocular el medio de cultivo. También se realizó la prueba de esterilidad a las bacterinas terminadas inoculando 0.5 ml del biológico en cada medio como se describió anteriormente. Así mismo, para comprobar que no sobrevivieron leptospiras en las diferentes bacterinas, se sembraron 0.5 ml de cada una en medio EMJH líquido, dichos cultivos se incubaron a 30 °C durante 21 días y se revisaron por microscopía de CO dos veces por semana para poder detectar un posible desarrollo de leptospiras.

### **5.4.3 ELABORACIÓN DE LAS BACTERINAS**

El procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad y fue el mismo para las diferentes bacterinas.

Se centrifugaron los cultivos a 16,000 xg durante 1 h (JOUAN, MR 1812), posteriormente se decantó el sobrenadante dejando la pastilla bacteriana en el tubo y se realizaron dos lavados con solución amortiguadora de fosfatos (SAF) pH 7 estéril adicionando a la pastilla bacteriana 20 ml y homogenizando gentilmente, posteriormente se centrifugó a 16,000 xg durante 1 h y se decantó el sobrenadante. Terminado el último lavado se decantó y se resuspendió la pastilla bacteriana con 10 ml de SAF, el microorganismo se inactivó adicionando una concentración final de 1% v/v de formol durante 24 h en agitación lenta (50 rpm). La inactivación total del microorganismo se verificó mediante la observación microscópica por CO del cultivo confirmando la ausencia de motilidad. El cultivo inactivado, se centrifugó a 16,000 xg durante 1 h y posteriormente se realizaron dos lavados con SAF. La pastilla bacteriana se resuspendió en 10 ml de SAF y se realizó un conteo de esta suspensión de leptospiras en la cámara de Petroff-Häusser (HAUSSER SCIENTIFIC ®) para calcular el número de leptospiras por ml. Finalmente, la bacterina se diluyó con SAF hasta obtener una concentración de  $2.4 \times 10^8$  o  $2.4 \times 10^9$  leptospiras inactivadas/ml.

Las bacterinas se distribuyeron en tubos de vidrio conteniendo 5 dosis (5 ml). La bacteria virulenta (bajo pasaje) con adyuvante (CL46-VA), fue adsorbida asepticamente en gel de hidróxido de aluminio estéril (Sigma), a una concentración de 1 mg/ml (por dosis), mediante agitación lenta (50 rpm) (Agitador Orbital Lab Line Shaker Dual action Mod. 3508) durante 12 h. Las bacterinas se conservaron a 4 °C hasta el momento de usarlas.

La composición final por dosis de 1 ml para cada bacteria fue la siguiente:

- Bacterias enteras inactivadas.....  $2.4 \times 10^8$ / ml o  $2.4 \times 10^9$ /ml
- Hidróxido de aluminio..... 1.00 mg (CL46-VA)

#### **5.4.4 PRUEBA DE INOCUIDAD**

Mediante esta prueba se verificó que las bacterinas no produjeran reacciones adversas en los animales inmunizados. Para esto, se inocularon 2 cobayos de la estirpe Hartley (*Cavia porcellus*), con un peso entre 250 a 300 g por cada bacteria elaborada por vía subcutánea con 2 ml del producto terminado y se observaron diariamente durante 14 días posteriores a la inoculación.

#### **5.5 PRUEBA DE POTENCIA PARA LAS BACTERINAS CON CUENTAS DE $2.4 \times 10^8$ LEPTOSPIRAS/ml**

##### **5.5.1 GRUPOS DE ANIMALES**

Se formaron seis grupos de 10 hámsteres cada uno. Cuatro de estos grupos se usaron para probar las bacterinas elaboradas (grupos 1 al 4) y los dos grupos restantes se usaron como testigos (grupos 5 y 6). En el Cuadro 5 se muestra el tratamiento aplicado a cada grupo.

CUADRO 5: GRUPOS DE HÁMSTERES PARA LA PRUEBA DE POTENCIA PARA LAS BACTERINAS CON CUENTAS DE  $2.4 \times 10^8$  LEPTOSPIRAS/ml

GRUPO	1	2	3	4	5	6
TRATAMIENTO	Bacterina CHU-IV	Bacterina CL46-I	Bacterina CL46-V	Bacterina CL46-VA	Testigo adyuvante	Testigo SSF
NÚMERO DE ANIMALES	10	10	10	10	10	10

Formulación de las bacterinas. 1: Canicola cepa Hond Utrecht IV (referencia), 2: Canicola cepa LOCaS46 no virulenta (alto pasaje), 3: Canicola Cepa LOCaS46 virulenta (bajo pasaje), 4: Canicola cepa LOCaS46 virulenta (bajo pasaje) con adyuvante (hidróxido de aluminio), 5: Hidróxido de aluminio, 6: SSF. Los hámsteres recibieron dos inmunizaciones por vía SC los días 0 y 14. Todos los animales fueron desafiados con 200 DL50 de la cepa virulenta LOCaS46 por vía IP el día 28.

### 5.5.2 ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN

La inmunización de los hámsteres con las diferentes bacterinas se realizó siguiendo el protocolo descrito en el Code of Federal Regulations (CFR) (CFR, 2004) para la prueba de potencia de la serovariedad Canicola. La inmunización de los animales de prueba, se efectuó con una dilución 1:80 de la dosis recomendada ( $2.4 \times 10^8$ ) de la bacterina en un volumen final de 0.25 ml en solución salina fisiológica estéril (SSF). La bacterina diluida se administró por vía subcutánea en la región dorsal con una jeringa de insulina. Los grupos testigo fueron inoculados con 0.25 ml de SSF o bien 0.25 ml de una suspensión de 1mg/ml de hidróxido de aluminio en SSF, también por vía subcutánea el mismo día que los demás animales. El esquema de inmunización consistió en dos inmunizaciones por vía subcutánea con 14 días de diferencia entre cada una (días cero y 14) (Figura 9).

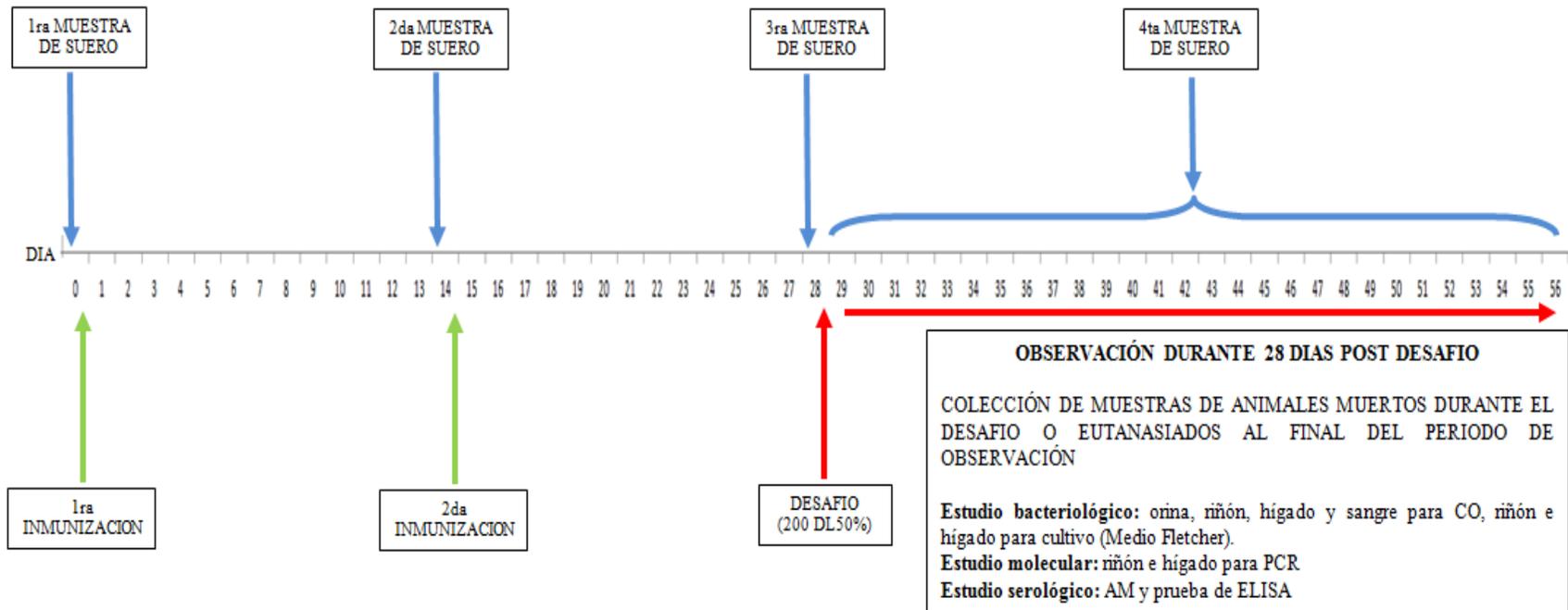


Figura 9: Cronograma de inmunización y colección de muestras para la prueba de potencia de las bacterinas con cuentas de  $2.4 \times 10^8$  y  $2.4 \times 10^9$  leptospiras/ml.

### **5.5.3 DESAFÍO**

El desafío de los diferentes grupos de animales se realizó 14 días después de la segunda inmunización (día 28) inoculando 200 DL50 de *Leptospira interrogans*, serovariedad Canicola, cepa LOCaS46 equivalente a 1000 microorganismos. El conteo de leptospiras se efectuó con una cámara Petroff Hausser (HAUSSER SCIENTIFIC ®) y se utilizó un cultivo de siete días de edad en medio EMJH que posteriormente se ajustó a 1,000 leptospiras en un volumen final de 0.5 ml de medio EMJH. La inoculación se realizó por vía intraperitoneal administrando el inóculo con una jeringa de insulina previa descontaminación de la región abdominal con etanol al 70%. Los animales se observaron durante los siguientes 28 días posdesafío y se llevó un registro de los animales muertos (Figura 9). La prueba de potencia se consideró satisfactoria cuando se presentó la muerte de por lo menos el 80% (8) de los animales del grupo testigo y cuando sobrevivió por lo menos el 80% o más de los animales inmunizados y desafiados.

### **5.5.4 COLECCIÓN DE MUESTRAS**

Se utilizó el mismo procedimiento de colección y procesamiento de muestras descrito anteriormente para los hámsteres de la DL50 con las siguientes consideraciones.

Se colectaron cuatro muestras de sangre de cada animal, la primera muestra justo antes de inmunizar a los hámsteres (día 0); la segunda y tercera muestras a los 14 días después de cada inmunización (días 14 y 28). Las muestras (500 µl) fueron colectadas por punción cardíaca previa anestesia con pentobarbital sódico (70 mg/kg/IP), excepto la cuarta muestra que se colectó después del desafío a la muerte de los animales y también de los que sobrevivieron al desafío previa eutanasia con pentobarbital sódico (sangrado en blanco por punción cardíaca). El cultivo bacteriológico de *Leptospira* se realizó a partir de las muestras de riñón e hígado de los animales que murieron y de los muertos por eutanasia.

Todos los animales de los diferentes grupos que fueron desafiados con la cepa

LOCaS46 y los que sobrevivieron fueron evaluados para determinar el estado de portador renal. El reaislamiento del microorganismo se realizó en medio semisólido Fletcher a partir de riñón e hígado, la microscopía de CO se realizó de las muestras de orina y sangre y de los macerados de riñón e hígado. La técnica de PCR se realizó a partir de los macerados de riñón e hígado utilizando los métodos anteriormente descritos.

### **5.5.5 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL**

#### **5.5.5.1 AGLUTINACIÓN MICROSCÓPICA (AM)**

La evaluación de los títulos de anticuerpos anti-*Leptospira* se realizó por medio de la prueba de AM, usando la metodología descrita anteriormente.

#### **5.5.5.2 ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMAS (ELISA)**

Para estandarizar la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos de los isotipos IgM e IgG, se usaron sueros testigos positivos de hámsteres desafiados experimentalmente con la serovariedad Canicola cepa LOCaS46 virulenta (bajo pasaje) y cepa LOCaS46 no virulenta (alto pasaje), atenuada mediante repetidos pases en medio de cultivo. Los sueros usados como control negativo se obtuvieron de hámsteres sanos.

El procedimiento de estandarización se realizó mediante ensayos de diluciones de los sueros controles positivos y negativos a partir de la dilución 1:10 y hasta 1:20,480 para obtener la dilución óptima del suero problema. El conjugado se probó con tres diluciones 1:10,000, 1:15,000 y 1:20,000. La sensibilización de las placas con el antígeno de captura se realizó con una concentración de  $2 \times 10^8$  leptospiras/ml de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola, cepa Hond Utrecht IV.

**PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO DE CAPTURA Y SENSIBILIZACIÓN DE LAS PLACAS:** Se utilizaron cultivos en medio líquido EMJH de 7 a 10 días de la

serovariedad Canicola cepa Hond Utrecht IV. La viabilidad de los cultivos se evaluó mediante observación microscópica por CO.

Se centrifugó el cultivo a 16,000 xg durante 1 h y se decantó el sobrenadante. Se agregaron 10 ml de SAF pH 7, se homogenizó suavemente la pastilla bacteriana y se centrifugó nuevamente a 16,000 xg durante 1 h, se decantó el sobrenadante en dos ocasiones. La pastilla se resuspendió en 10 ml de SAF y se inactivó al microorganismo con formol a una concentración de 1% v/v durante 12 h en agitación lenta. Se realizaron dos lavados con SAF como se describió anteriormente y finalmente se resuspendió la pastilla bacteriana a una concentración final de  $2 \times 10^8$  leptospiras/ml. El conteo de *Leptospiras* se realizó con una cámara de conteo bacteriano Petroff-Hausser (HAUSSER SCIENTIFIC ®). Las placas se sensibilizaron con 100 µl por pozo del antígeno diluido y se incubaron a 50 °C durante toda la noche. Se utilizaron placas de ELISA de poliestireno de fondo plano de 96 pozos (EVERGREEN ®). Las células no adsorbidas se eliminaron mediante 5 lavados con solución de lavado (SAF con 0.05% (v/v) de Tween 20), agregando en cada pozo 200 µl de la solución de lavado y agitando durante 5 min cada vez (Soluciones: Apéndice II).

**PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA DE ELISA:** Las placas fueron bloqueadas inicialmente con 200 µl en cada pozo de solución de bloqueo (solución de lavado con 3% de leche descremada), la placa se incubó durante 1 h a 37 °C. Se realizó un lavado con 200 µl de solución de lavado por pozo en agitación durante 5 min. Los sueros de los hámsteres se diluyeron en solución de incubación (SAF con leche descremada al 3%, 0.05% de Tween 20).

La estandarización de la técnica para la detección de anticuerpos del isotipo IgM e IgG se realizó mediante diluciones seriadas a partir de 1:10 hasta 1:20,480. Se agregaron 100 µl de dilución a cada uno de los pozos y se incubó durante 1 h a 37°C. Posteriormente se realizó un lavado agregando 200 µl de solución de lavado por pozo en agitación durante 5 min. Se utilizaron como conjugados anticuerpos de conejo anti-IgG (Jackson ImmunoResearch®) y anti-IgM (Rockland Immunochemicals for

Research®), de hámster sirio (*Mesocricetus auratus*) marcados con peroxidasa y diluidos 1:10,000, 1:15,000 y 1:20,000 en solución de incubación; agregando 100 µl de dilución a cada uno de los pozos e incubando durante 1 h a 37°C. Se hicieron tres lavados agregando 200 µl de solución de lavado por pozo en agitación durante 5 min. El revelado se realizó adicionando el producto comercial OPD Fast (1 mg/ml) y buffer urea, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.4 mg/ml OPD, 0.4 mg/ml peróxido de hidrogeno urea y 0.05 M de fosfato de citrato pH 5) revisar formula (Sigma ®) agregando 100 µl de solución de revelado por pozo e incubándose durante 30 min a 37 °C, en oscuridad. Para detener la reacción enzimática se agregaron 100 µl de solución de paro (HCl 2N), por pozo. La lectura se hizo a una densidad óptica (DO) de 490 nm, en un lector de ELISA (ELX800 UNIVERSAL MICROPLATE READER BIO-TEK INSTRUMENT, INC). Las soluciones de trabajo se encuentran descritas en el Apéndice II.

El punto de corte se estableció como la media aritmética de las muestras negativas más dos desviaciones estándar. El análisis estadístico se realizó con los programas EXCEL (Microsoft Office®) y SPSS Versión 16.0

## **5.6 PRUEBA DE POTENCIA PARA LAS BACTERINAS CON CUENTAS DE $2.4 \times 10^9$ LEPTOSPIRAS/ml**

### **5.6.1 GRUPOS DE ANIMALES**

La prueba de potencia de las bacterinas con  $2.4 \times 10^9$ /ml leptospiras se realizó en 34 animales divididos en cuatro, grupos la distribución de los grupos y tratamientos se detallan en el Cuadro 6.

CUADRO 6: GRUPOS DE HÁMSTERES PARA LA PRUEBA DE POTENCIA PARA LAS BACTERINAS CON CUENTAS DE  $2.4 \times 10^9$  LEPTOSPIRAS/ml

GRUPO	7	8	9	10
TRATAMIENTO	Bacterina CHU-IV	Bacterina CL46-I	Bacterina CL46-V	Testigo SSF
NÚMERO DE ANIMALES	10	10	10	4

Formulación de las bacterinas. 7: Canicola cepa Hond Utrecht IV (referencia), 8: Canicola cepa LOCaS46 no virulenta (alto pasaje), 9: Canicola Cepa LOCaS46 virulenta (bajo pasaje), 10: SSF. Los hámsteres recibieron dos inmunizaciones por vía SC los días 0 y 14. Todos los animales fueron desafiados con 200 DL50 de la cepa virulenta LOCaS46 por vía IP el día 28.

La preparación de las bacterinas, esquema de inmunización, desafío, colección de muestras, evaluación de la respuesta inmune humoral y la evaluación del estado de portador renal se realizaron como se describió anteriormente.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 CÁLCULO DE LA DOSIS LETAL 50% (DL50)

Después de realizada la infección se registraron las muertes ocurridas en los cuatro diferentes grupos durante los siguientes 18 días, como se describe a continuación.

#### GRUPO 1: HÁMSTERES INFECTADOS CON 100 MICROORGANISMOS

En este grupo murieron seis animales (75%) con signos y lesiones características de la enfermedad, entre el día 9 y 10 posteriores a la infección y dos hámsteres sobrevivieron sin presentar signos de enfermedad (25%).

El cultivo bacteriológico de los seis animales que murieron fue positivo, reaislándose leptospiras a partir de las muestras de riñón e hígado (hámsteres 1, 2, 3, 4, 5 y 6) y de orina y sangre (hámsteres 5 y 6): la observación microscópica de CO de las mismas muestras de los 6 animales fue positiva a formas similares a *Leptospira*. La prueba de PCR aplicada a las muestras de riñón e hígado también fue positiva para los seis animales (Figura 10). La prueba de AM reportó títulos de 1:320 para el animal 5, el suero del animal 6 fue negativo y en cuanto a los animales 1, 2, 3 y 4 no se pudo obtener una muestra de sangre (Apéndice III Cuadro A).

De los dos animales que sobrevivieron, el hámster 7 fue positivo al aislamiento bacteriológico a partir de las muestras de orina y riñón, sin embargo el campo oscuro de orina, riñón, hígado y sangre fue negativo a formas similares. La PCR de riñón e hígado fue negativa, a pesar del aislamiento positivo a partir de riñón, la AM reportó títulos de 1:2,560. El hámster 8 fue negativo para el aislamiento bacteriológico, CO, PCR y AM (Apéndice III Cuadro A).

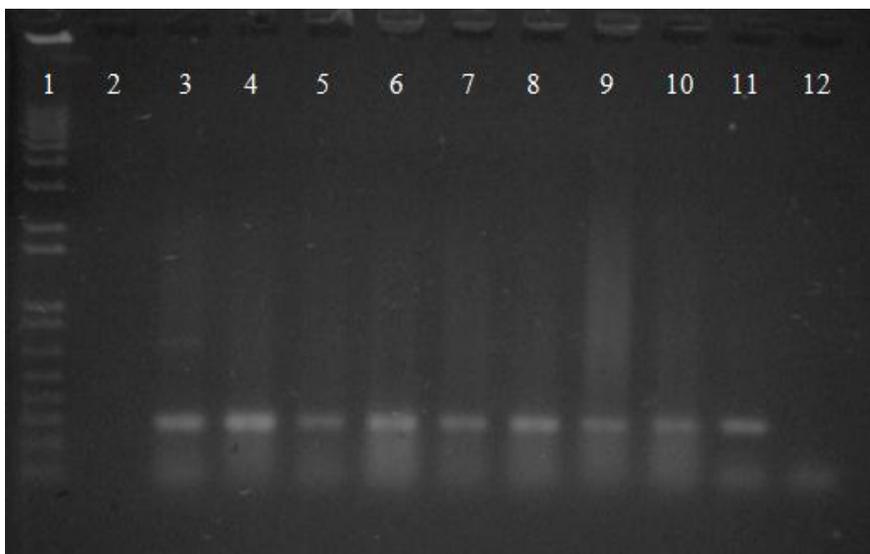


Figura 10: PCR positivo de hámsteres infectados con 100 leptospiras de la cepa LOCaS46 que murieron durante el desafío. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Vacio. Carril 3 y 4: Muestras de riñón e hígado del hámster 1. Carril 5 y 6: Muestras de riñón e hígado del hámster 2. Carril 7 y 8: Muestras de riñón e hígado del hámster 3. Carril 9 y 10: Muestras de riñón e hígado del hámster 4. Carril 11: Control positivo de ADN de la cepa LOCaS46, banda de ADN de 285 pb. Carril 12: Control negativo agua destilada.

## GRUPO 2: HÁMSTERES INFECTADOS CON 10 MICROORGANISMOS

En este grupo murieron siete hámsteres (87.5%) con signos y lesiones de enfermedad entre los días 10 y 12 posteriores a la infección. Sobrevivió un animal sin presentar signos de enfermedad y del cual se reaisló al microorganismo a partir de las muestras de orina y riñón, la microscopia de CO reportó formas similares a *Leptospira* en orina, la prueba de PCR fue positiva en riñón e hígado y la AM detectó títulos de 1:2,560 (Apéndice III Cuadro B).

El cultivo bacteriológico fue positivo a partir de una o varias muestras en los siete animales que murieron (individuos del 1 al 7); en cuanto a la observación microscópica de CO solamente el hámster 5 fue negativo a formas similares a *Leptospira*. La prueba de PCR fue positiva para seis animales (individuos 1, 2, 3 y 7 en riñón e hígado; individuos 4 y 5 en hígado) y negativa para un animal (individuo 6). La prueba de AM reportó tres animales positivos con títulos de 1:20 (hámsteres 2

y 3) y 1:40 (hámster 7), del animal 5 no se obtuvo muestra de suero (Apéndice III Cuadro B).

### GRUPO 3: HÁMSTERES INFECTADOS CON 5 MICROORGANISMOS

En este grupo murieron cinco animales (62.5%) entre los días 10 y 11 posteriores a la infección y sobrevivieron tres animales sin presentar signos ni lesiones de enfermedad. Los cinco animales que murieron fueron positivos al reislamiento del microorganismo a partir de una o varias muestras (Figura 12); la microscopia de CO también fue positiva a formas similares a *Leptospira* para los cinco animales; la prueba de PCR fue positiva en riñón e hígado para los animales 1, 2 y 3, positiva en hígado para el hámster 4 y negativa en riñón e hígado para el animal 5. En cuanto a la AM, los sueros presentaron títulos de 1:20 (hámster 5) y 1:320 (hámster 3), los animales 1 y 2 fueron negativos y del hámster 4 no se obtuvo muestra de suero (Apéndice III Cuadro C).

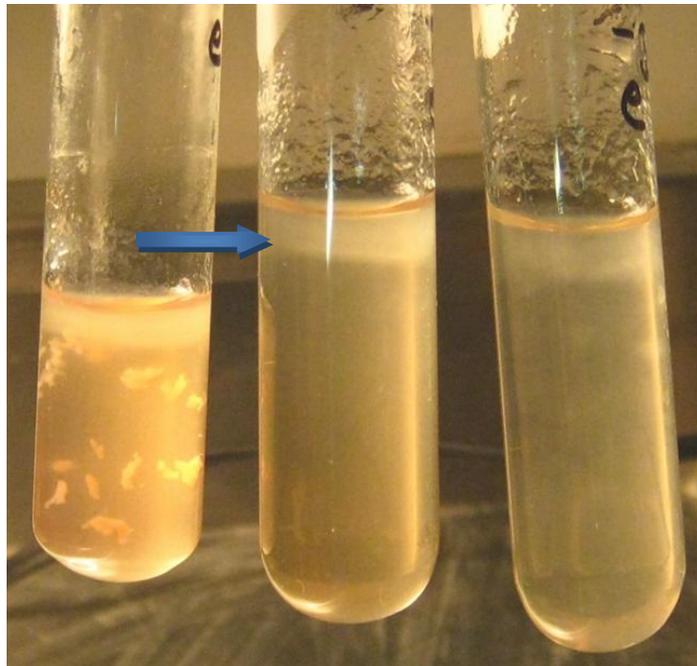


Figura 11: Reislamiento de *Leptospira* en medio Fletcher a partir de macerado de riñón del hámster 2 infectado con 5 microorganismos de la cepa LOCaS46. En el cultivo macroscópicamente se observa la zona o anillo de Dinger (Flecha).

Los tres animales que sobrevivieron a la infección (individuos 6, 7 y 8), fueron positivos al cultivo bacteriológico a partir de orina, riñón, hígado y sangre, la prueba de PCR fue positiva en riñón e hígado para el hámster 8 y negativa para ambas muestras en los animales 6 y 7, la prueba de AM del animal 8 reportó títulos de 1:20 y los hámsteres 6 y 7 fueron negativos (Apéndice III Cuadro C).

#### GRUPO 4: HÁMSTERES INFECTADOS CON 1 MICROORGANISMO

En este grupo murieron cuatro animales (50%), entre los días 10 y 11 posteriores a la infección y cuatro sobrevivieron sin presentar signos y lesiones de enfermedad.

Los cuatro hámsteres que murieron fueron positivos en el cultivo bacteriológico, aislándose leptospiras a partir de las diferentes muestras colectadas (hígado, riñón, sangre y orina). Los animales 1, 2 y 3 también fueron positivos a formas similares a *Leptospira* por medio de la observación de CO, la prueba de la AM reportó títulos de 1:20 (hámster 2) y 1:40 (hámsteres 3 y 4), el animal 1 fue negativo (Apéndice III Cuadro D).

Los cuatro animales que sobrevivieron fueron negativos para el cultivo bacteriológico, microscopia de CO y PCR; en cuanto a la prueba de AM, se reportaron títulos de 1:20 (hámster 6) y 1:40 (hámster 8), los sueros de los hámsteres 5 y 7 no mostraron títulos (Apéndice III Cuadro D).

En la Figura 12 se muestra el porcentaje de sobrevivencia de los animales en los diferentes grupos de la DL50, lo hámsteres que murieron mostraron signos de enfermedad dentro de los primeros 9 a 12 días posteriores a la infección.

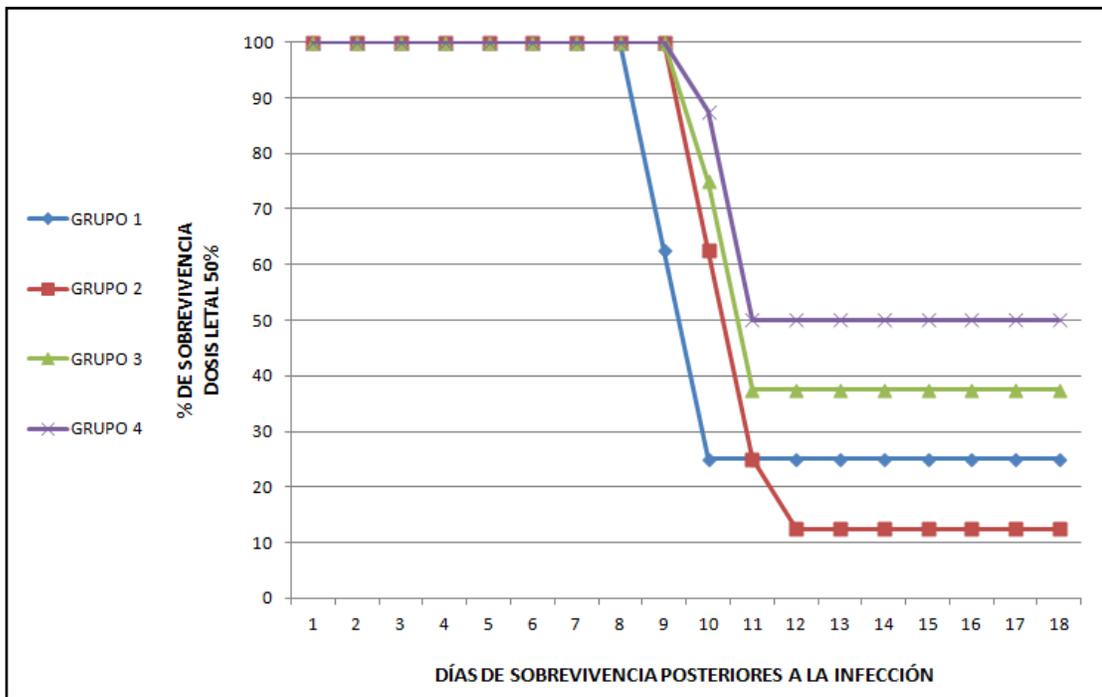


Figura 12: Porcentaje de supervivencia de los 4 grupos de hámsteres para el cálculo de la DL50. Grupo 1: Hámsteres inoculados con 100 microorganismos. Grupo 2 Hámsteres inoculados con 10 microorganismos. Grupo 3: Hámsteres inoculados con 5 microorganismos. Grupo 4: Hámsteres inoculados con 1 microorganismo.

A continuación se muestra el cálculo realizado para obtener la DL50 por el método de Reed y Muench y en el Cuadro 7 se muestran los datos de la mortalidad registrada en cada grupo con los cuales se calculó la DL50. (Reed and Muench, 1938).

$$\text{Formula: } DP = \frac{\% > 50\% - 50}{\% > 50\% - \% < 50\%}$$

$$PF = (\log \text{ dilución con más del } 50\% \text{ de mortalidad}) + (DP \times \log \text{ dilución})$$

Donde: DP= Distancia Proporcional

PF= Punto final

Logaritmo (log) dilución = 0.69

Sustituyendo:  $DP = 60-50 / 60-28.57 = 10 / 31.43 = 0.318$

$PF = (-6.75) + (0.318 \times 0.69)$

$= -6.75 + 0.21 = -6.96$

$TÍTULO = 10^{-6.96} DL_{H50\%} / 0.5 \text{ ml} = 4.85 \text{ leptospiras}$

La DL50 calculada en hámsteres para la serovariedad Canicola cepa LOCaS46 fue de 4.85 leptospiras (5 leptospiras).

CUADRO 7: DATOS PARA EL CÁLCULO DE LA DL50 DE LA SEROVARIEDAD Canicola CEPA LOCaS46

NÚMERO DE <i>Leptospiras</i> INOCULADAS (DILUCIÓN)	ANIMALES MUERTOS/ ANIMALES INOCULADOS	ANIMALES MUERTOS	ANIMALES SOBREVIVIENTES	RESULTADOS ACUMULADOS			% ANIMALES MUERTOS
				ANIMALES MUERTOS ACUMULADOS ↑	ANIMALES SOBREVIVIENTES ACUMULADOS ↓	TOTAL ACUMULADO	
<b>GRUPO 1</b> 100 leptospiras (-5.25)	6/8	6	2	22	2	24	22/24= <b>91.6%</b>
<b>GRUPO 2</b> 10 leptospiras (-6.25)	7/8	7	1	16	3	19	16/19= <b>84.2%</b>
<b>GRUPO 3</b> 5 leptospiras (-6.75)	5/8	5	3	9	6	15	9/15= <b>60%</b>
<b>GRUPO 4</b> 1 leptospira (-7.25)	4/8	4	4	4	10	14	4/14= <b>28.57%</b>

## SIGNOS CLÍNICOS Y LESIONES MACROSCÓPICAS

Los signos clínicos que se observaron en los animales que murieron durante la DL50, infectados con 100, 10, 5 o 1 microorganismo en general fueron: depresión, pelo hirsuto, anorexia, emaciación y caquexia. También se observó disnea, debilidad muscular, postración, incoordinación y convulsiones, el cuadro neurológico se presentó entre una y dos horas antes de la muerte (Figura 13).

Las lesiones macroscópicas que se observaron fueron hemorragias multifocales de leves a severas en el parénquima pulmonar, congestión hepática y renal y hemorragias en intestinos y peritoneo. En algunos casos se detectó hemoptisis, hematuria, hipostenuria e ictericia (Figura 13). En el Cuadro 8 se muestra el resumen de lesiones observadas por animal y por grupo de la DL50.

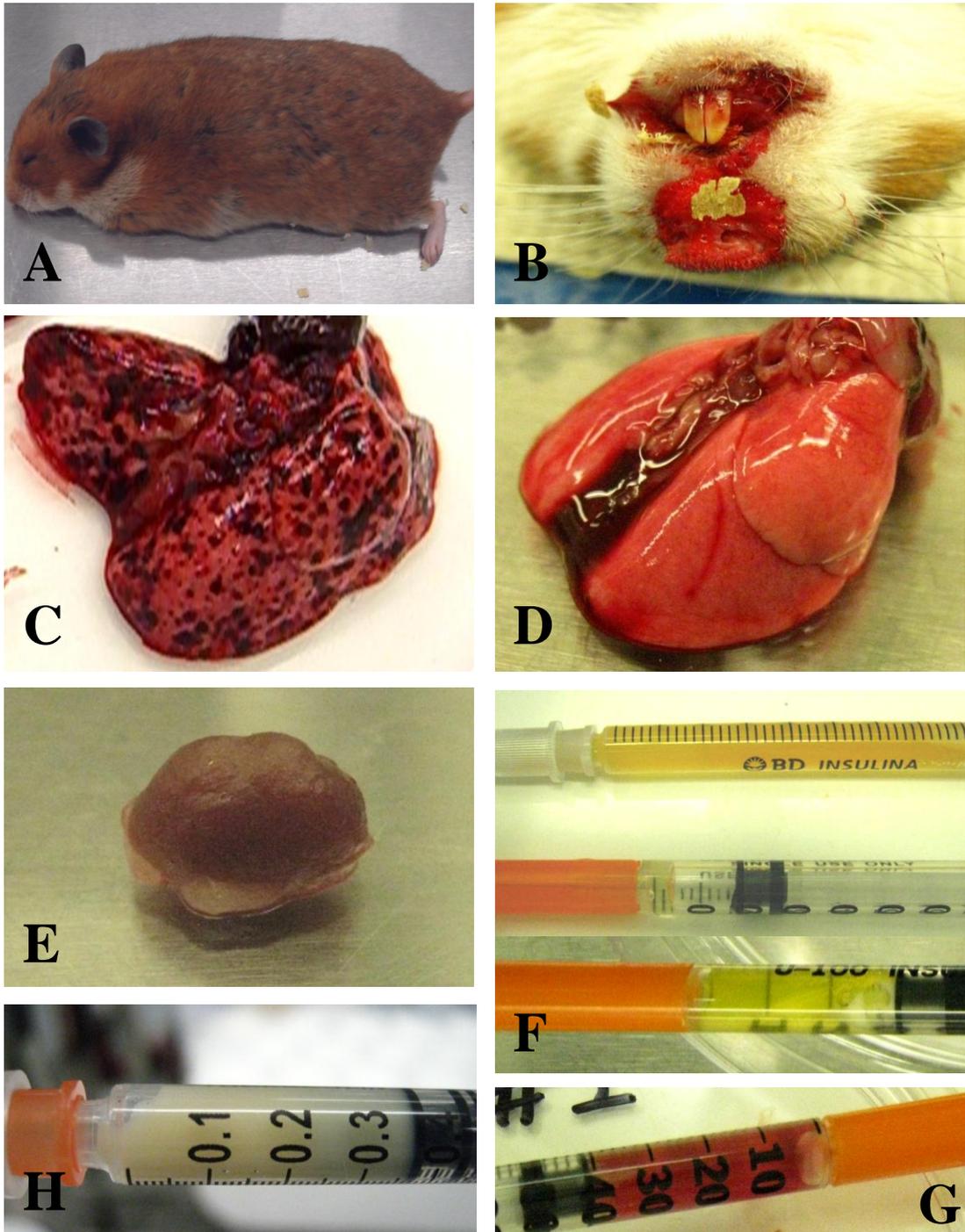


Figura 13: Signos clínicos y lesiones macroscópicas en hámsteres infectados con la cepa LOCaS46 de *L. interrogans* (DL50). A) Postración: hámster 4 infectado con 10 leptospiras. B) Hemoptisis: hámster 4 infectado con 100 leptospiras. C) Hemorragias pulmonares severas difusas: hámster 6 infectado con 10 leptospiras muerto a los 11 días posteriores a la infección. D) Pulmones sin lesiones aparentes: hámster 7 infectado con 100 leptospiras que sobrevivió a la infección. E) Riñón con la superficie de la corteza renal rugosa: hámster 8 infectado con 10 leptospiras que sobrevivió a la infección y que fue sacrificado a los 18 días posteriores a la infección. F) Jeringas con orina mostrando hipostenuria. G) Jeringa con orina mostrando hematuria. H) Jeringa con orina de hámster con apariencia normal.

CUADRO 8: LESIONES OBSERVADAS DURANTE LA DL50

NÚMERO DE LEPTOSPIRAS INOCULADAS	IDENTIFICACIÓN DEL HAMSTER	PULMÓN (Hemorragias)	INTESTINO (Hemorragias)	HÍGADO (Congestión)	RIÑÓN (Congestión)	ORINA	OTRO	TIPO DE MUERTE
100	1	+++	+	1	1			MS
	2	+++	++	1	1			MS
	3	+++	++	1	1			MS
	4	++	+	1	1		Hemoptisis	MS
	5	+++	++	1	1	Hipostenuria		MS
	6	+++	+	1	1	Hematuria		MS
	7	S/L	S/L	0	0			E
	8	S/L	S/L	0	0			E
10	1	+++	+	1	1	Hematuria	Hemoptisis	MS
	2	+++	+	1	1	Hematuria		MS
	3	+++	++	1	1			MS
	4	++	+	1	1	Hematuria	Ictericia, S/Nerviosa	MS
	5	+++	++	1	1	Hematuria	Hemoptisis	MS
	6	+++	++	1	1	Hematuria		MS
	7	+++	++	1	1	Hematuria		MS
	8	+	S/L	0	0	Hipostenuria	Corteza renal rugosa	E
5	1	++	+	1	1	Hipostenuria		MS
	2	+++	++	1	1	Hematuria		MS
	3	+++	++	1	1			MS
	4	+++	+	1	1		Ictericia	MS
	5	+++	+	1	0			MS
	6	S/L	S/L	0	0			E
	7	+	S/L	0	0			E
	8	+	S/L	0	0			E
1	1	+++	+	1	1	Hematuria		MS
	2	+++	++	1	1			MS
	3	+++	++	1	1	Hematuria		MS
	4	+++	++	1	1			MS
	5	S/L	S/L	0	0			E
	6	+	S/L	0	0			E
	7	S/L	S/L	0	0			E
	8	S/L	S/L	0	0			E

Hemorragias: + Leve, ++ Moderada, +++ Severa.

Congestión: 1=Presencia, 0=Ausencia

Tipo de muerte: E=Animal muerto por eutanasia sin signos clínicos, MS=Animal muerto con signos clínicos

S/L=Sin lesiones

S/Nerviosa= Sinología nerviosa

## 6.2 FORMULACIÓN DE BACTERINAS

La prueba de esterilidad realizada se consideró satisfactoria para los cuatro biológicos elaborados ya que no se observó desarrollo de microorganismos contaminantes en los diferentes medios de cultivo (agar sangre, agar Sabouraud y caldo tioglicolato), durante y después de 21 días de incubación a 37°C. También se comprobó que los 4 biológicos no contenían leptospiras viables, ya que no se observó desarrollo de *Leptospiras* en medio EMJH líquido durante y después de 21 días de incubación a 30°C. La prueba de inocuidad realizada en cobayos se consideró satisfactoria ya que ninguno de los 8 animales inoculados con las diferentes bacterinas, mostró reacciones indeseables atribuibles a los biológicos; los animales permanecieron sanos durante y después de los 14 días posteriores a la inoculación con 2 ml de la bacterina por vía subcutánea.

Los biológicos cumplieron con los lineamientos de seguridad, demostrando ser inocuos en cobayos, y por tal razón, fueron sometidos a la prueba de potencia en hámsteres.

## 6.3 ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA DE ELISA

Los parámetros de estandarización de la prueba de ELISA se seleccionaron tomando en cuenta la mayor discriminación entre los controles positivos y negativos, la dilución óptima de trabajo de las muestras de suero fue de 1:200 para la detección de anticuerpos del isotipo IgG y 1:40 para la detección de anticuerpos del isotipo IgM. Se usó en ambos casos una dilución 1:15,000 para el conjugado anti-IgG (Jackson ImmunoResearch ®) o anti-IgM (Rockland Immunochemicals for Research ®), de hámster en conejo) y una concentración de  $2 \times 10^8$  leptospiras/ml (*Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa Hond Utrecht IV), como concentración óptima del antígeno de captura para la sensibilización de las placas.

La prueba de ELISA para la detección de anticuerpos del isotipo IgM aplicada a 51 sueros negativos, estimó como punto de corte, la media de la  $DO_{490nm}$  de los sueros

negativos (0.181), más dos desviaciones estándar 0.072 (2 x 0.036), lo que establece como límite de detección 0.253 DO<sub>490nm</sub> para considerar la muestra como positiva.

De manera similar, la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos del isotipo IgG aplicada a 72 sueros negativos, estimó como punto de corte, la media de la DO<sub>490nm</sub> de los sueros negativos (0.136) más dos desviaciones estándar 0.082 (2 x 0.041) lo que establece como límite de detección 0.218 DO<sub>490nm</sub> para considerar la muestra como positiva.

#### **6.4 PRUEBA DE POTENCIA PARA LAS BACTERINAS CON CUENTAS DE $2.4 \times 10^8$ LEPTOSPIRAS/ml**

GRUPO 1: BACTERINA CHU-IV (Canicola CEPA Hond Utrecht IV REFERENCIA)

En este grupo murió el 60 % de los animales (6 hámsteres) entre el día 7 y 8 postdesafío y sobrevivió el 40 % (4 hámsteres), los cuales presentaron signos leves de enfermedad (depresión, pelo hirsuto), posteriormente mostraron mejoría y al momento de ser sacrificados no presentaban signos de enfermedad.

La prueba de AM y ELISA de la primera muestra (antes de inmunizar), fue negativa para los diez animales. La segunda muestra de sangre, colectada 14 días después de la primera inmunización fue negativa por AM y ELISA para nueve hámsteres (animales del 1 al 9), el suero del animal 10 presentó títulos por AM de 1:20 y por la prueba de ELISA se detectaron anticuerpos del isotipo IgG (0.306 DO<sub>490nm</sub>). La tercera muestra de suero tomada 14 días después de la segunda inmunización, también fue negativa por AM para nueve animales (hámsteres del 2 al 10); de estos animales la prueba de ELISA detectó anticuerpos del isotipo IgG para los animales 3 y 10 (0.272 y 0.306 DO<sub>490nm</sub>), mientras que el hámster 1 presentó títulos por AM de 1:80 y por la prueba de ELISA se le detectaron anticuerpos del isotipo IgM (0.268 DO<sub>490nm</sub>).

La cuarta muestra de suero tomada de los seis animales que murieron durante el desafío, mostraron títulos por AM de 1:20 para los hámsteres 4 y 9, mientras que la

prueba de ELISA detectó anticuerpos del isotipo IgM para ambos animales (0.277 y 0.268 DO<sub>490nm</sub> respectivamente). La prueba de AM de los cuatro animales que sobrevivieron al desafío mostraron títulos de 1:20 (animal 1), 1:1,280 (animales 2 y 3) y 1:160 (animal 10), la prueba de ELISA detectó anticuerpos del isotipo IgM para el hámster 1 (0.392 DO<sub>490nm</sub>) y anticuerpos del isotipo IgM e IgG para los animales 2, 3 y 10 (0.466, 0.506, 0.546 DO<sub>490nm</sub> respectivamente). En cuanto a la determinación del estado de portador renal de los animales que sobrevivieron al desafío, los cuatro hámsteres fueron negativos para el cultivo bacteriológico y PCR de las muestras de riñón e hígado (Apéndice IV Cuadro A). Observándose una protección contra el estado de portador renal del 100% en los animales sobrevivientes al desafío.

#### GRUPO 2: BACTERINA CL46-I (Canicola CEPA LOCaS46 NO VIRULENTA ALTO PASAJE)

En este grupo murió el 50% de los animales (5 hámsteres) entre el día 1 al 10 postdesafío y el 50% sobrevivió, estos animales también presentaron signos leves de enfermedad (depresión, pelo hirsuto) y posteriormente mostraron mejoría, al momento de ser sacrificados no presentaban signos de enfermedad.

En cuanto a la prueba de AM de la primera muestra de suero (antes de inmunizar), sólo el hámster 5 mostró títulos de 1:20 y la prueba de ELISA de este animal detectó anticuerpos del isotipo IgM (0.269 DO<sub>490nm</sub>). La prueba de AM y ELISA de la segunda muestra de suero tomada 14 días después de la primera inmunización, mostró títulos de 1:20 y detectó anticuerpos del isotipo IgG (0.220 DO<sub>490nm</sub>) para el animal 7. Los nueve animales restantes fueron negativos por AM, pero la prueba de ELISA detectó anticuerpos del isotipo IgG (0.319 DO<sub>490nm</sub>) para el animal 5 y anticuerpos del isotipo IgM para el animal 10 (0.256 DO<sub>490nm</sub>). La tercera muestra de suero tomada 14 días después de la segunda inmunización fue negativa por AM para los diez animales, sin embargo, la prueba de ELISA detectó anticuerpos del isotipo IgG para los animales 1, 3, 8 y 9 (0.219, 0.256, 0.221 y 0.238 DO<sub>490nm</sub> respectivamente). La cuarta muestra de suero tomada de los animales que murieron durante el desafío fue negativa para los hámsteres 2, 4 y 6 por las pruebas de AM y

ELISA, de los dos animales restantes (7 y 10), no fue posible obtener una muestra de suero. En cuanto a los sueros de los cinco animales que sobrevivieron al desafío, por medio de la prueba de AM se detectaron títulos de 1:2,560 (hámsteres 1 y 3), 1:1,280 (hámster 8), 1:40 (hámster 9) y 1:20 (hámster 5); la prueba de ELISA detectó anticuerpos del isotipo IgM e IgG para los hámsteres 1, 3, 8 y 9 (0.838, 1.789; 0.605, 1.283; 0.637, 1.498; y 0.342, 0.232 DO<sub>490nm</sub> respectivamente), para el hámster 5 solamente se detectaron anticuerpos del isotipo IgM (0.335 DO<sub>490nm</sub>). Referente a la determinación del estado de portador de los animales que sobrevivieron al desafío, solamente el hámster 1 fue positivo al aislamiento del *Leptospira* a partir de riñón y la prueba de PCR fue negativa para esta muestra, los cuatro hámsteres restantes fueron negativos para el cultivo bacteriológico y PCR (animales 3, 5, 8 y 9), lo que muestra, que solo el 20% de los animales sobrevivientes al desafío quedaron como portadores renales de *Leptospira* (Apéndice IV Cuadro B).

### GRUPO 3: BACTERINA CL46-V (Canicola CEPA LOCaS46 VIRULENTA BAJO PASAJE)

En este grupo murió el 70% de los animales (7 hámsteres) entre el día 7 y 9 postdesafío y sobrevivió el 30%, estos animales también presentaron signos leves de enfermedad (depresión, pelo hirsuto) y posteriormente mostraron mejoría, al momento de ser sacrificados no presentaban signos de enfermedad.

Las pruebas de AM y ELISA de la primera muestra de suero (antes de inmunizar) fueron negativas para los diez animales. La segunda muestra de suero colectada 14 días después de la primera inmunización también fue negativa por AM para los diez animales, sin embargo, la prueba de ELISA detectó a cuatro animales positivos: hámsteres 3 y 10 con el isotipo IgM (0.278 y 0.276 DO<sub>490nm</sub>), hámster 5 con el isotipo IgG (0.283 DO<sub>490nm</sub>) y hámster 4 con los isotipos IgM e IgG (0.320 y 0.330 DO<sub>490nm</sub>). La tercera muestra de suero tomada 14 días después de la segunda inmunización fue positiva por AM y ELISA para un animal (hámster 6), con un título de 1:20 y con el isotipo IgM (0.270 DO<sub>490nm</sub>), los nueve animales restantes fueron negativos con las dos pruebas. La cuarta muestra de suero tomada de los animales que murieron

durante el desafío mostró por AM títulos de 1:80 (hámster 2) y 1:40 (hámster 3), estos animales también fueron positivos por la prueba de ELISA detectándose anticuerpos del isotipo IgM (hámster 2 con 0.277 DO<sub>490nm</sub>) e IgG (hámster 3 con 0.241 DO<sub>490nm</sub>). Los cinco hámsteres restantes (individuos 1, 6, 7, 8 y 9), fueron negativos con la prueba de AM, sin embargo, el hámster 6 fue positivo por la prueba de ELISA detectándose anticuerpos del isotipo IgM e IgG (0.357 y 0.292 DO<sub>490nm</sub>). En cuanto a los tres animales que sobrevivieron al desafío la AM mostró títulos de 1:2,560 (animales 4 y 5) y 1:20 (animal 10). La prueba de ELISA detectó anticuerpos del isotipo IgM e IgG para los hámsteres 4 y 5 (0.535, 0.801 y 0.755, 1.698 DO<sub>490nm</sub>) e IgM para el hámster 10 (0.318 DO<sub>490nm</sub>). En cuanto a la determinación del estado de portador renal de los tres animales que sobrevivieron al desafío, solamente se realizó a *Leptospira* a partir del riñón del hámster 5, la PCR de esta muestra fue negativa, lo que muestra que sólo el 33.33% de los animales sobrevivientes quedaron como portadores renales de *Leptospira* (Apéndice IV Cuadro C).

#### GRUPO 4: BACTERINA CL46-VA (Canicola CEPA LOCaS46 VIRULENTA BAJO PASAJE CON ADYUVANTE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO)

En el grupo 4 murió el 100% de los animales (10 hámsteres) entre el día 8 y 24 postdesafío (Apéndice IV Cuadro D). La prueba de AM y ELISA de la primera muestra de suero (antes de inmunizar) fue negativa para los diez animales. La segunda muestra de suero tomada 14 días después de la primera inmunización fue positiva por AM para los animales 4 y 5 con títulos de 1:20 y la prueba de ELISA detectó anticuerpos del isotipo IgM para ambas muestras (0.298 y 0.271 DO<sub>490nm</sub> respectivamente) y el hámster 1 fue positivo por la prueba de ELISA detectándose anticuerpos del isotipo IgG (0.222 DO<sub>490nm</sub>). La tercera muestra de suero tomada 14 días después de la segunda inmunización fue negativa por AM para los diez animales, mientras que la prueba de ELISA fue positiva para tres animales con anticuerpos del isotipo IgM (animal 5 con 0.260 DO<sub>490nm</sub>) e IgG (animales 4 y 8 con 0.283 y 0.263 DO<sub>490nm</sub>). La prueba de AM aplicada a la cuarta muestra de suero tomada de los diez animales que murieron durante el desafío, detectó títulos de 1:80 en el suero del

hámster 3, mientras que la prueba de ELISA detectó anticuerpos del isotipo IgG (0.608 DO<sub>490nm</sub>). La prueba de AM no mostró títulos en los animales restantes, sin embargo, la prueba de ELISA detectó anticuerpos del isotipo IgG en el suero de tres animales (animales 2, 8 y 9 con 0.342, 0.363 y 0.237 DO<sub>490nm</sub> respectivamente) y anticuerpos del isotipo IgG e IgM para el hámster 4 (0.261 y 1.921 DO<sub>490nm</sub>) (Apéndice IV Cuadro D).

#### GRUPO 5: TESTIGO ADYUVANTE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO

En este grupo murió el 100% de los animales (10 hámsteres) entre el día 7 y 8 postdesafío. La prueba de AM de la primera muestra de suero (antes de la administración del adyuvante) fue negativa para los diez animales, mientras que la prueba de ELISA detectó a un animal positivo con anticuerpos del isotipo IgM (hámster 10 con 0.258 DO<sub>490nm</sub>). La segunda muestra de suero tomada 14 días después de la primera administración del adyuvante fue positiva por AM para los animales 6 y 10, pero con títulos de 1:20. La prueba de ELISA de estos animales detectó anticuerpos del isotipo IgG (0.223 y 0.235 DO<sub>490nm</sub>). También se detectaron anticuerpos del isotipo IgG (0.256 DO<sub>490nm</sub>) en el suero del animal 3. La tercera muestra de suero tomada 14 días después de la segunda administración del adyuvante fue negativa por AM y ELISA para los diez animales. La cuarta muestra de suero mostró títulos de 1:40 por AM y la prueba de ELISA detectó anticuerpos del isotipo IgM (0.260 DO<sub>490nm</sub>) en el suero del hámster 2 y anticuerpos del isotipo IgG en el suero del hámster 5 (0.334 DO<sub>490nm</sub>) (Apéndice IV Cuadro E).

#### GRUPO 6: TESTIGO SSF

En este grupo también murió el 100% de los animales (10 hámsteres) entre el día 8 y 9 postdesafío (Apéndice IV Cuadro F). La prueba de AM y ELISA de la primera muestra de suero (antes de la administración de la SSF) fue positiva para un animal (individuo 7) con un título de 1:20 y anticuerpos del isotipo IgM (0.270 DO<sub>490nm</sub>). La segunda y tercera muestras de suero fueron negativas para los diez animales por las pruebas de AM y ELISA. La cuarta muestra de suero tomada de los animales que

murieron durante el desafío mostró por las pruebas de AM y ELISA títulos de 1:40 y 1:20 y anticuerpos del isotipo IgM en los sueros de los hámsteres 4 y 9 respectivamente (0.288 y 0.255 DO<sub>490nm</sub>) (Apéndice IV Cuadro F).

Los resultados globales de la prueba de potencia, así como el número y porcentaje de los animales que presentaron un cuadro clínico, animales portadores renales y nivel de protección contra la infección renal (animales de los que no se aisló *Leptospira*) se detallan en el cuadro 9.

CUADRO 9. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE POTENCIA PARA LAS BACTERINAS CON CUENTAS DE  $2.4 \times 10^8$  LEPTOSPIRAS/ml

GRUPO	1	2	3	4	5	6
TRATAMIENTO	Bacterina CHU-IV	Bacterina CL46-I	Bacterina CL46-V	Bacterina CL46-VA	Testigo adyuvante	Testigo SSF
NO. ANIMALES POR GRUPO	10	10	10	10	10	10
NO. DE MUERTOS (%)	6 (60%)	5 (50%)	7 (70%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
NO. DE SOBREVIVIENTES (%)	4 (40%)	5 (50%)	3 (30%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
NO. DE ANIMALES QUE PRESENTARON CUADRO CLÍNICO DESPUES DEL DESAFÍO (%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
NO. DE ANIMALES SOBREVIVIENTES AL DESAFÍO QUE FUERON PORTADORES RENALES DE <i>Leptospira</i> (%)	0 (0%)	1 (20%)	1 (33.33%)	No aplica	No aplica	No aplica
NO. DE ANIMALES SOBREVIVIENTES AL DESAFÍO DE LOS QUE NO SE AISLÓ <i>Leptospira</i> (% DE PROTECCIÓN CONTRA LA INFECCIÓN RENAL)	4 (100%)	4 (80%)	2 (66.66%)	No aplica	No aplica	No aplica

1: Canicola cepa Hond Utrecht IV (referencia). 2: Canicola cepa LOCaS46 no virulenta (alto pasaje). 3: Canicola Cepa LOCaS46 virulenta (bajo pasaje). 4: Canicola cepa LOCaS46 virulenta (bajo pasaje) con adyuvante (hidróxido de aluminio). 5: Hidróxido de aluminio. 6: SSF.

En la Figura 14 se muestra graficado el porcentaje de sobrevivencia postdesafío de los animales en los diferentes grupos, donde se observa que tanto los animales inmunizados y controles murieron dentro de los primeros 10 días posteriores al desafío con signos de enfermedad, a excepción del hámster número 6 del grupo 4 inmunizado con la bacteria CL46-VA el cual sobrevivió durante 24 días a pesar de que presento durante todo ese tiempo signos clínicos de enfermedad. Los animales sobrevivientes al desafío también mostraron signos de enfermedad, posteriormente se recuperaron y al momento de ser sacrificados al final del periodo de observación no mostraban signos clínicos. En todos los grupos inmunizados y desafiados el porcentaje de sobrevivencia fue menor al 80%, mientras que en los grupos testigos (Grupo 5 hidróxido de aluminio y Grupo 6 SSF) murieron el 100% de los animales.

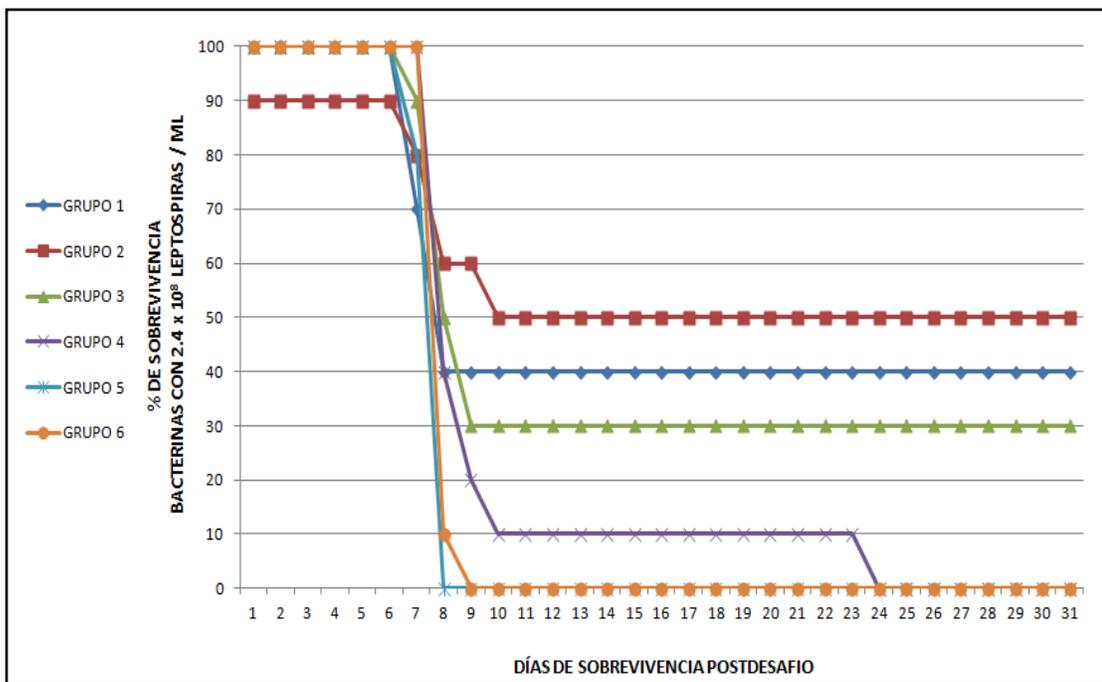


Figura 14: Porcentaje de sobrevivencia postdesafío de los 6 grupos de hámsteres de la prueba de potencia para las bacterinas con cuentas de  $2.4 \times 10^8$  leptospiras/ml. Grupo 1: Canicola cepa Hond Utrecht IV (referencia). Grupo 2: Canicola cepa LOCaS46 no virulenta (alto pasaje). Grupo 3: Canicola Cepa LOCaS46 virulenta (bajo pasaje). Grupo 4: Canicola cepa LOCaS46 virulenta (bajo pasaje) con adyuvante (hidróxido de aluminio). Grupo 5: Hidróxido de aluminio. Grupo 6: SSF.

La evaluación global de la respuesta inmunológica mediante la prueba de AM mostró que 14 días después de completado el esquema de inmunización con las bacterinas CHU-IV y CL46-V el 10% de los animales en cada grupo alcanzó un título  $\geq 1:20$ , mientras que los grupos inmunizados con las bacterinas CL46-I y CL46-VA no mostraron seroconversión. Sin embargo después del desafío se observaron títulos desde 1:20 hasta 1:2560 en los animales inmunizados con las bacterinas CHU-IV, CL46-I, CL46-V y CL46-VA (60%, 50%, 50% y 10% de seroconversión respectivamente). Los animales controles no inmunizados (Grupo 5 hidróxido de aluminio y Grupo 6 SSF) mostraron después del desafío títulos desde 1:20 hasta 1:40 en el 10% y 20% de los animales respectivamente.

La evaluación global de la respuesta inmunológica mediante la prueba de ELISA mostró que los cuatro diferentes bacterinas (CHU-IV, CL46-I, CL46-V y CL46-VA) con cuentas de  $2.4 \times 10^8$  microorganismos/ml no indujeron un incremento significativo en la producción de anticuerpos tanto del isotipo IgM (Figura 15A) como del isotipo IgG (Figura 15B), aun después de la segunda inmunización.

Finalmente no se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ) en cuanto a la producción de anticuerpos en los grupos inmunizados con respecto a los grupos testigos no inmunizados mediante las técnicas de AM y ELISA.

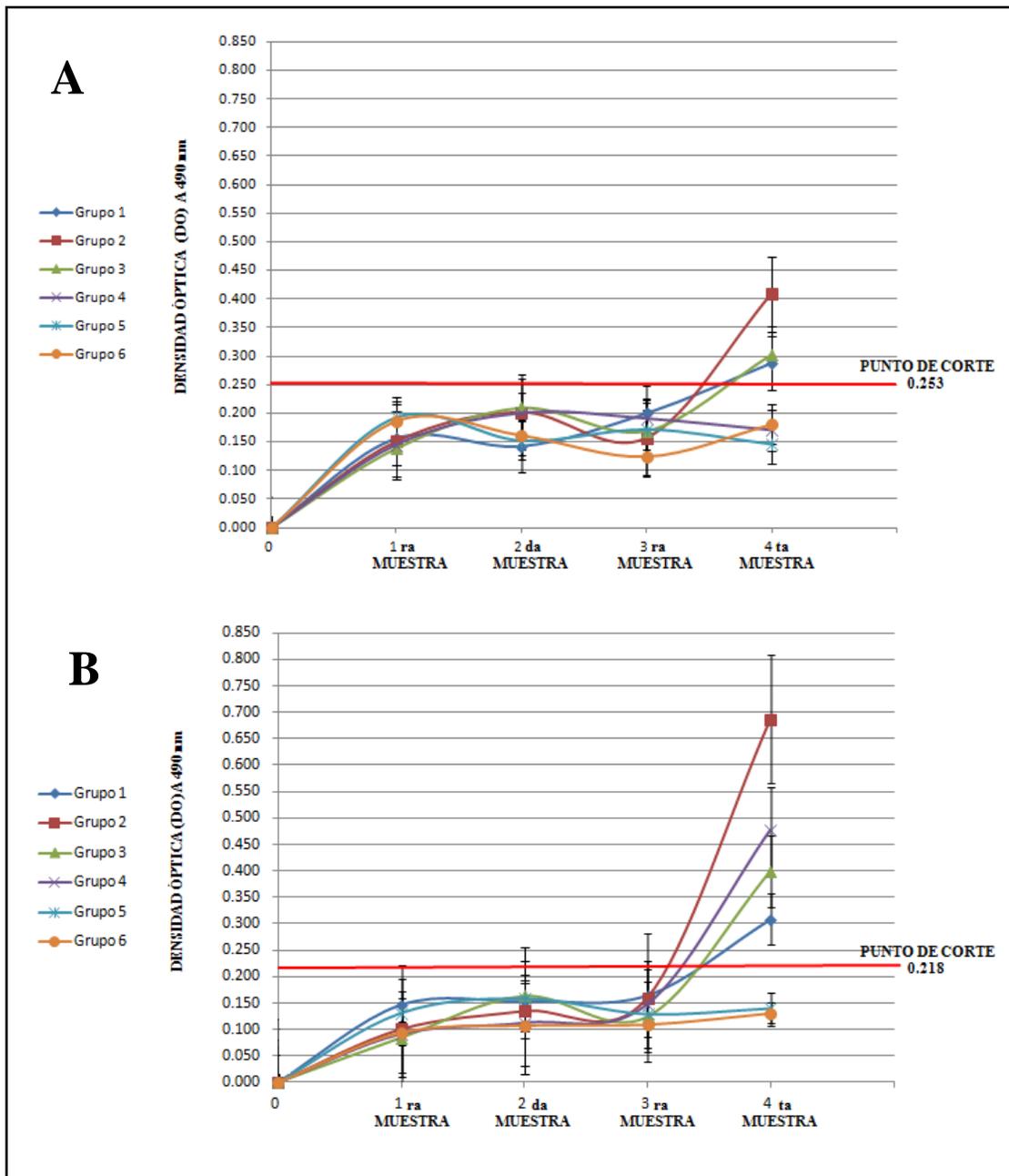


Figura 15: Respuesta inmunológica inducida en hámsteres por las bacterinas con cuentas de  $2.4 \times 10^8$  microorganismos/ml. La densidad óptica fue determinada mediante la prueba de ELISA y los datos corresponden a las medias  $\pm$  dos desviaciones estándar de 10 animales evaluados por grupo. A) Respuesta IgM. B) Respuesta IgG. 1ra Muestra: Antes de la inmunización. 2da Muestra: 14 días después de la primera inmunización. 3ra Muestra: 14 días después de la segunda inmunización. 4ta Muestra: 31 días después del desafío. Grupo 1: Bacterina CHU-IV (Canicola cepa Hond Utrecht IV referencia). Grupo 2: Bacterina CL46-I (Canicola cepa LOCaS46 no virulenta de alto pasaje). Grupo 3: Bacterina CL46-V (Canicola Cepa LOCaS46 virulenta de bajo pasaje). Grupo 4: Bacterina CL46-VA (Canicola cepa LOCaS46 virulenta de bajo pasaje con adyuvante hidróxido de aluminio). Grupo 5: Hidróxido de aluminio. Grupo 6: SSF.

## **6.5 PRUEBA DE POTENCIA PARA LAS BACTERINAS CON CUENTAS DE $2.4 \times 10^9$ LEPTOSPIRAS/ml**

GRUPO 7: BACTERINA CHU-IV (Canicola CEPA Hond Utrecht IV REFERENCIA)

En este grupo, murió sólo un hámster (10%), en el día 8 postdesafío y sobrevivió el 90% de los animales sin mostrar signos de enfermedad hasta el momento de aplicarles la eutanasia. Las pruebas de AM y ELISA de la primera muestra de suero (antes de inmunizar), fueron negativas para los diez animales. La segunda muestra de suero colectada 14 días después de la primera inmunización, fue positiva por las pruebas de AM y ELISA para un animal (hámster 4), con un título de 1:40 y anticuerpos del isotipo IgM (0.261 DO<sub>490nm</sub>) respectivamente. La tercera muestra de suero tomada 14 días después de la segunda inmunización, fue negativa por AM para ocho individuos y positiva para dos animales con títulos de 1:160 y 1:640 (hámster 4 y 6, respectivamente), mientras que la prueba de ELISA detectó anticuerpos del isotipo IgG para los animales 4, 6, 8 y 10 (0.233, 0.240, 0.582 y 0.241 DO<sub>490nm</sub>, respectivamente). La cuarta muestra de suero tomada de los nueve animales que sobrevivieron al desafío, mostró por AM títulos de 1:320, 1:1,280 y 1:20 en los sueros de los hámsteres 4, 6 y 7 respectivamente; mientras que la prueba de ELISA detectó anticuerpos de los isotipos IgM e IgG para los animales 4, 5, 6 y 7 (0.458, 0.426; 0.407, 0.449; 0.405, 0.630 y 0.442, 0.509 DO<sub>490nm</sub> respectivamente), entre tanto los animales 2, 3, 8, 9 y 10 fueron positivos únicamente para el isotipo IgM (0.262, 0.307, 0.446, 0.345 y 0.322 DO<sub>490nm</sub>, respectivamente).

En cuanto a la determinación del estado de portador renal de los nueve animales sobrevivientes al desafío, el cultivo bacteriológico fue negativo y no se aisló a *Leptospira* en ninguna de las muestras; así mismo la prueba de PCR también fue negativa para las muestras de riñón e hígado (Apéndice V Cuadro A). Lo que muestra que el 100% de los animales sobrevivientes al desafío evitaron la infección renal.

Las pruebas de diagnóstico aplicadas al hámster que murió durante el desafío (individuo 1) mostraron lo siguiente, la microscopía de CO fue positiva a formas

similares a *Leptospira* en las muestras de orina, riñón, hígado y sangre, el cultivo bacteriológico y la técnica de PCR fueron positivas para las dos muestras trabajadas (riñón e hígado), Las pruebas de AM y ELISA fueron negativas para la primera, segunda y tercera muestra, no se pudo obtener la cuarta muestra de suero (Apéndice V Cuadro A).

#### GRUPO 8: BACTERINA CL46-I (Canicola CEPA LOCaS46 NO VIRULENTA ALTO PASAJE)

En este grupo no murió ningún animal sobreviviendo al desafío el 100% de los hámsteres inmunizados. La prueba de AM y ELISA aplicada a la primera muestra de suero (antes de inmunizar), fue negativa para los diez animales. La segunda muestra de suero colectada 14 días después de la primera inmunización, fue positiva por ELISA y AM para dos animales con anticuerpos del isotipo IgM (0.270 y 0.261 DO<sub>490nm</sub>) y títulos de 1:160 y 1:40 (individuos 3 y 6, respectivamente). La tercera muestra de suero tomada 14 días después de la segunda inmunización, fue positiva por AM para seis animales con títulos de 1:20 (individuos 6 y 9), 1:80 (individuos 1, 4 y 8) y 1:320 (individuo 3), mientras que la prueba de ELISA detectó anticuerpos del isotipo IgG en 7 animales (hámsteres 1, 3, 4, 6, 7, 8 y 9 con 0.228, 0.771, 0.260, 0.236, 0.309, 0.221 y 0.335 DO<sub>490nm</sub> respectivamente). La prueba AM aplicada a la cuarta muestra de suero colectada de los diez animales que sobrevivieron al desafío, mostró en los sueros de siete animales títulos de 1:20 (hámsteres 4, 5, 6 y 9) y 1:40 (hámsteres 1, 3 y 8), mientras que la prueba de ELISA detectó anticuerpos del isotipo IgM e IgG en los diez animales (0.470, 0.449; 0.347, 0.287; 0.506, 0.524; 0.544, 0.626; 0.429, 0.338; 0.557, 0.361; 0.411, 0.325; 0.513, 0.435; 0.427, 0.365 y 0.442, 0.384 DO<sub>490nm</sub> respectivamente) (Apéndice V Cuadro B). El cultivo bacteriológico y la prueba de PCR aplicada a las muestras de riñón e hígado de los diez animales fueron negativos, no detectándose animales portadores de *Leptospira* (Apéndice V Cuadro B), lo que demuestra que el 100% de los animales sobrevivientes al desafío evitaron la infección renal.

#### GRUPO 9: BACTERINA CL46-V (Canicola CEPA LOCaS46 VIRULENTA BAJO PASAJE)

En este grupo también sobrevivió el 100% de los animales inmunizados sin mostrar signos de enfermedad hasta el momento de aplicárseles la eutanasia. La prueba de AM y ELISA de la primera muestra de suero (antes de inmunizar) fue negativa para los diez animales. La segunda muestra de suero colectada 14 días después de la primera inmunización, fue positiva por AM y ELISA para dos animales (individuos 4 y 5) ambos con un título de 1:20 y anticuerpos del isotipo IgM (0.259, 0.299 DO<sub>490nm</sub> respectivamente). La tercera muestra de suero tomada 14 días después de la segunda inmunización fue positiva por AM para 4 animales con títulos de 1:80 (individuo 2), 1:40 (individuos 4 y 7) y 1:20 (individuo 6); por medio de la prueba de ELISA se detectaron siete hámsteres positivos con anticuerpos del isotipo IgG (individuos del 2 al 7 y 10 con 0.233, 0.399, 0.347, 0.240, 0.251, 0.269 y 0.276 DO<sub>490nm</sub>). La prueba de AM aplicada a la cuarta muestra de suero tomada de los diez animales que sobrevivieron al desafío, fue positiva solamente para un animal con un título de 1:20 (hámster 4), con la prueba de ELISA los 10 hámsteres fueron positivos aunque los hámsteres 2, 6, 7, 8 y 10 con el isotipo IgM (0.339, 0.602, 0.573, 0.651 y 0.735 DO<sub>490nm</sub> respectivamente) y los hámsteres 1, 3, 4, 5 y 9 con ambos isotipos IgM e IgG (0.409, 0.302; 0.431, 0.242; 0.430, 0.264; 0.381, 0.278 y 0.340, 0.223 DO<sub>490nm</sub>, respectivamente) (Apéndice V Cuadro C).

En cuanto a la determinación del estado de portador de los diez animales sobrevivientes al desafío, el cultivo bacteriológico fue negativo y no se realizó a *Leptospira* en ninguna de las muestras, así mismo la prueba de PCR fue negativa para todas las muestras de riñón e hígado (Apéndice V Cuadro C), lo que demuestra que el 100% de los animales sobrevivientes al desafío evitaron la infección renal.

#### GRUPO 10: TESTIGO SSF

En este grupo murió el 100% de los animales (4 hámsteres) entre el día 9 y 13 postdesafío (Apéndice V, Cuadro D). La prueba de AM y ELISA de la primera, segunda y tercera muestra de suero fueron negativas para los cuatro animales.

Después del desafío no fue posible obtener la cuarta muestra de suero de ninguno de los cuatro hámsteres (Apéndice V Cuadro D).

Los resultados globales de la prueba de potencia, así como el número y porcentaje de los animales que presentaron un cuadro clínico, animales portadores renales y nivel de protección contra la infección renal (animales de los que no se aisló *Leptospira*) se detallan en el cuadro 10.

CUADRO 10: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE POTENCIA PARA LAS BACTERINAS CON CUENTAS DE  $2.4 \times 10^9$  LEPTOSPIRAS/ml

GRUPO	7	8	9	10
TRATAMIENTO	Bacterina CHU-IV	Bacterina CL46-I	Bacterina CL46-V	Testigo SSF
NO. ANIMALES POR GRUPO	10	10	10	4
NO. DE MUERTOS (%)	1 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (100%)
NO. DE SOBREVIVIENTES (%)	9 (90%)	10 (100%)	10 (100%)	0 (0%)
NO. DE ANIMALES QUE PRESENTARON CUADRO CLÍNICO DESPUES DEL DESAFÍO (%)	1 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (100%)
NO. DE ANIMALES SOBREVIVIENTES AL DESAFÍO QUE FUERON PORTADORES RENALES DE <i>Leptospira</i> (%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	No aplica
NO. DE ANIMALES SOBREVIVIENTES AL DESAFÍO DE LOS QUE NO SE AISLÓ <i>Leptospira</i> (% DE PROTECCIÓN CONTRA LA INFECCIÓN RENAL)	9 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	No aplica

7: Canicola cepa Hond Utrecht IV (referencia). 8: Canicola cepa LOCaS46 no virulenta (alto pasaje). 9: Canicola Cepa LOCaS46 virulenta (bajo pasaje). 10: SSF.

En la Figura 16 se muestra el porcentaje de sobrevivencia postdesafío de los animales en los diferentes grupos, donde se observa que el único animal que murió con signos de enfermedad fue en el día 8 postdesafío y perteneció al grupo 7 inmunizado con la bacterina CHU-IV (hámster 1). Los grupos 7, 8 y 9 que fueron inmunizados con los diferentes biológicos alcanzaron un porcentaje de sobrevivencia mayor al 80%, mientras que en el grupo 10 Testigo SSF murió el 100% de los animales desafiados.

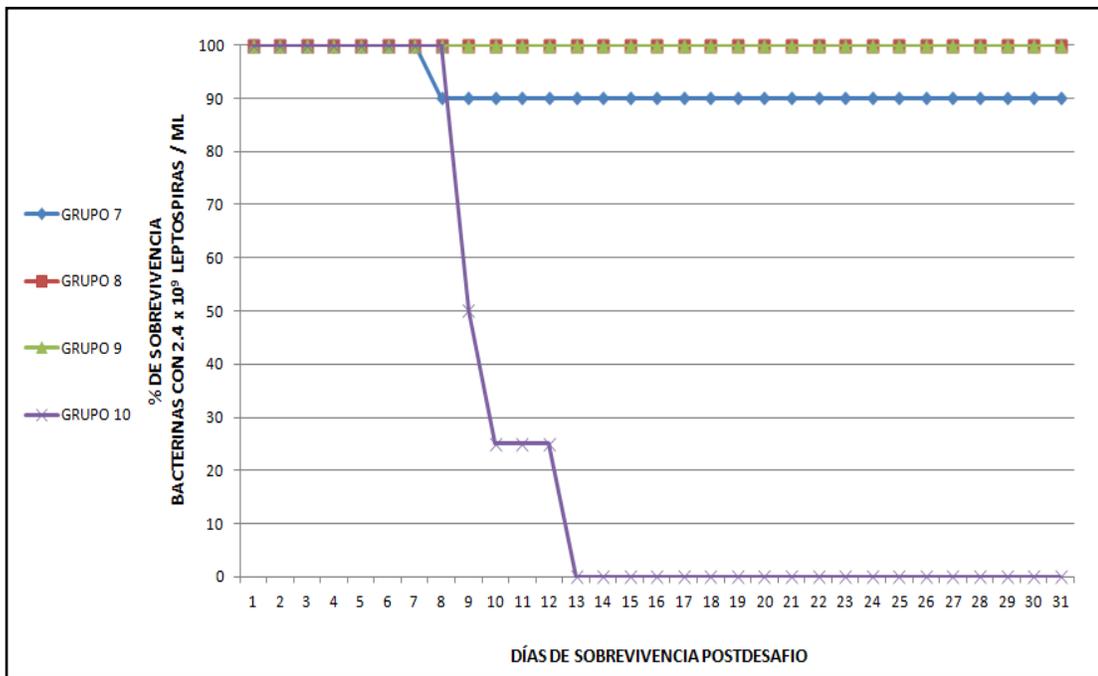


Figura 16: Porcentaje de sobrevivencia postdesafío de los 4 grupos de hámsteres de la prueba de potencia para las bacterinas con cuentas de  $2.4 \times 10^9$  leptospiras/ml: Grupo 7: Canicola cepa Hond Utrecht IV (referencia). Grupo 8: Canicola cepa LOCaS46 no virulenta (alto pasaje). Grupo 9: Canicola cepa LOCaS46 virulenta (bajo pasaje). Grupo 10: Testigo SSF.

La evaluación global de la respuesta inmunológica mediante la prueba de AM mostró que 14 días después de completado el esquema de inmunización con las bacterinas CHU-IV, CL46-I y CL46-V se alcanzó una seroconversión en el 20%, 60% y 40% en cada grupo respectivamente con títulos de 1:20 hasta 1:640. Sin embargo después del desafío se observaron títulos desde 1:20 hasta 1:1280 en los animales inmunizados de los tres grupos. De los animales controles no inmunizados del Grupo 10 SSF no fue posible obtener la cuarta muestra de sangre después del desafío.

La evaluación global de la respuesta inmunológica mediante la prueba de ELISA mostró que las tres diferentes bacterinas (CHU-IV, CL46-I y CL46-V) con cuentas de  $2.4 \times 10^9$  microorganismos/ml no indujeron un incremento significativo en la producción de anticuerpos del isotipo IgM (Figura 17A) aun después de la segunda inmunización, sin embargo se detectó un incremento significativo en la producción de anticuerpos del isotipo IgG (Figura 17B) después de la segunda inmunización con las tres bacterinas.

Finalmente, mediante las técnicas de AM y ELISA no se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ) en cuanto a la producción de anticuerpos en los grupos inmunizados con respecto al grupo 10 Testigos SSF (no inmunizado) en la segunda muestra de suero (15 días después de la primera inmunización), sin embargo si se observaron diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) por medio de la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos del isotipo IgG en la tercera muestra de suero (15 días después de la segunda inmunización) en los tres grupos inmunizados con respecto al grupo 10 Testigos SSF (no inmunizado).

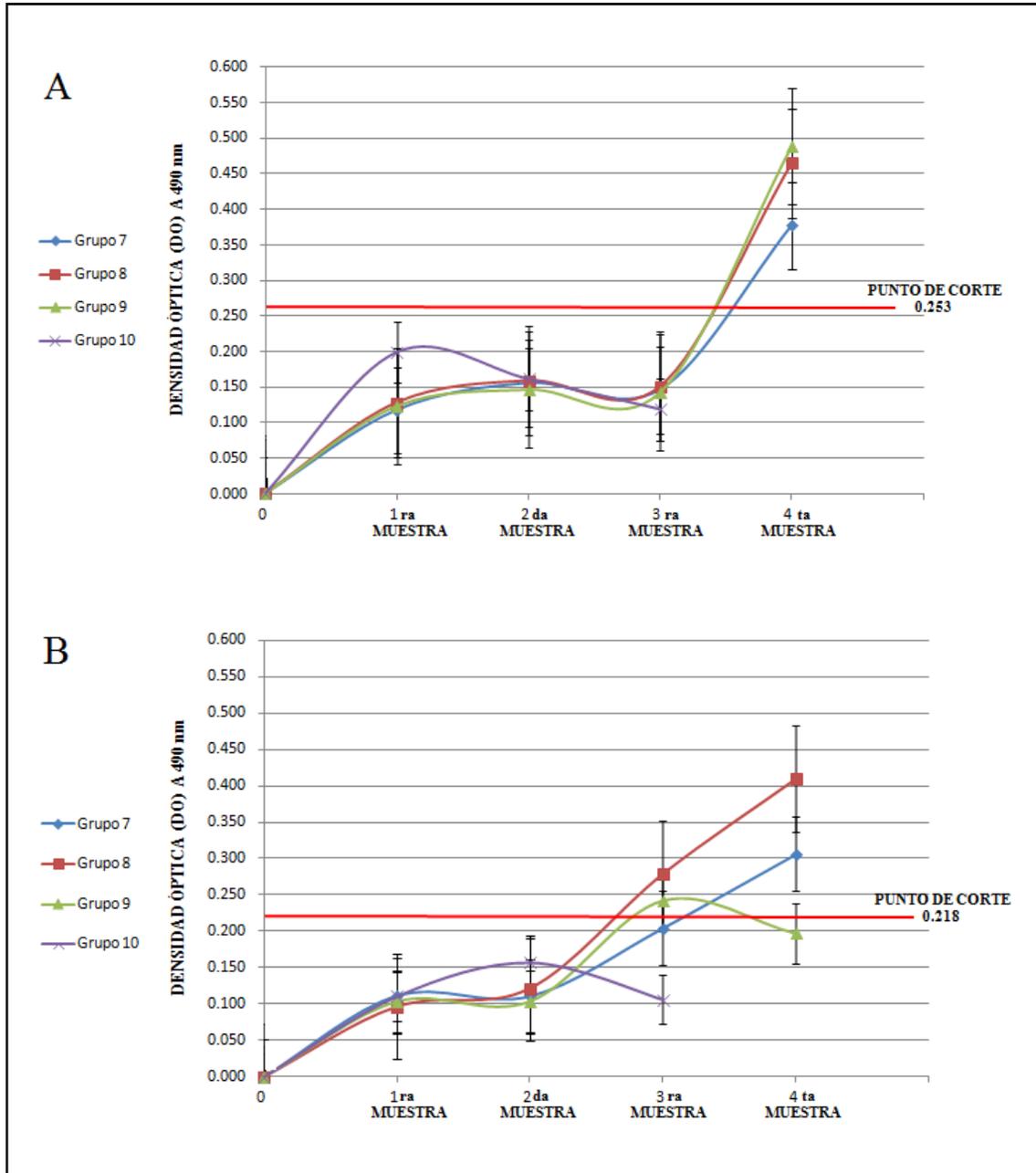


Figura 17: Respuesta inmunológica inducida en hámsteres por las bacterinas con cuentas de  $2.4 \times 10^9$  microorganismos/ml. La densidad óptica fue determinada mediante la prueba de ELISA y los datos corresponden a las medias  $\pm$  dos desviaciones estándar de 10 animales evaluados por grupo. A) Respuesta IgM. B) Respuesta IgG. 1ra Muestra: Antes de la inmunización. 2da Muestra: 14 días después de la primera inmunización. 3ra Muestra: 14 días después de la segunda inmunización. 4ta Muestra: 31 días después del desafío. Grupo 7: Bacterina CHU-IV (Canicola cepa Hond Utrecht IV referencia). Grupo 8: Bacterina CL46-I (Canicola cepa LOCaS46 no virulenta de alto pasaje). Grupo 9: Bacterina CL46-V (Canicola Cepa LOCaS46 virulenta de bajo pasaje). Grupo 10: SSF.

## 7 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizó la evaluación de la respuesta inmune estimulada por bacterinas formuladas con un aislado de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46 en su forma virulenta y no virulenta (atenuada), comparando su efectividad con otra bacterina elaborada a partir de la cepa de referencia Hond Utrecht IV no virulenta de la misma serovariedad y especie. Es conocido que las bacterinas formuladas con aislados virulentos obtenidos en la región confieren una mejor protección que aquellas que son formuladas con cepas de referencia (Faine *et al.*, 1999; Sonrier *et al.*, 2001). Este fenómeno ha sido relacionado a varios factores por ejemplo: que la pérdida de virulencia va acompañada de una reducción de antigenicidad, falta de epítopes que los aislados virulentos expresan *in vivo* y que dejan de producir al adaptarse a las condiciones de laboratorio, que las serovariedades infectantes tienen variaciones genómicas en comparación con las cepas de referencia o simplemente que se aplican bacterinas con serovariedades diferentes a la que está causando la enfermedad en una región determinada (Zeigler *et al.*, 1976; Sonrier *et al.*, 2001).

En México desde 1959 se han realizado numerosos estudios serológicos sobre leptospirosis en perros, detectándose por medio de la prueba de AM anticuerpos con mayor frecuencia contra las serovariedades Canicola, Bratislava, Icterohaemorrhagiae Pyrogenes, Portland-vere y Pomona (Varela, 1959; Felix, 1963; Arroyo, 1966; Rivera *et al.*, 1999; Castillo-Sánchez, 2008; Luna *et al.*, 2008), aunque también se ha reportado positividad contra otras serovariedades menos comunes como Autumnalis, Ballum, Bataviae, Grippotyphosa, Sejroe, Tarassovi y Wolffi (Palacios, 1983; Sánchez-Mejorada, 1992; Rivera *et al.*, 1999, Chávez-Trejo, 2006).

Los biológicos comerciales que actualmente se utilizan en el país son formulados con serovariedades elegidas con base en la prevalencia serológica conocida en determinada especie (Srivastava, 2006) y sin tomar en cuenta que en México no existe evidencia (aislados) de la presencia de algunas de estas serovariedades, como es el caso de las serovariedades Pomona, Grippothyposa, Tarassovi y Wolffi

(Rosenstein, 2005). Al incluir estas serovariedades en los biológicos comerciales aparte de no estar protegiendo a los animales contra la cepa causante de la enfermedad, aumenta el número de serovariedades detectadas en los estudios serológicos, lo cual proporciona datos falsos, sobre todo en comunidades urbanas donde la bacterinización es una práctica común (Prescott *et al.*, 2002).

Si bien no es práctico realizar el aislamiento de *Leptospira* con fines de diagnóstico debido a que es un microorganismo de difícil y lento desarrollo (Levett, 2001), éste se debe de realizar tanto en animales como en humanos con fines epidemiológicos y de investigación en todos los laboratorios especializados, ya que el aislamiento aparte de confirmar en forma definitiva e irrefutable el diagnóstico de leptospirosis proporciona certeza sobre las serovariedades circulantes en la región. Los trabajos de investigación normalmente excluyen al cultivo bacteriológico para *Leptospira* y son escasos los autores que han tenido éxito en el aislamiento, los aislados viables reportados que actualmente se tienen pertenecen a las serovariedades Canicola cepas CEL60 (Morales, 2004), LOCaS28, LOCaS31, LOCaS34, LOCaS46, LOCaS59 (Castillo-Sánchez, 2008; Carmona-Gasca, 2011), UADY (Vado-Solis, comunicación personal; Carmona-Gasca, 2011), Icterohaemorrhagiae cepa Palo Alto y Portland-Vere cepa Lissa (Luna *et al.*, 2008), identificadas con métodos moleculares y serológicos (Castillo-Sánchez, 2008; Luna *et al.*, 2008; Carmona-Gasca, 2011). Aunque también existe otro reporte previo de aislados que solamente fueron identificados serológicamente como serovariedad Canicola, no hallándose datos posteriores sobre su viabilidad o su utilización en otros estudios (cepas AC1, AC2, AC3, AA4, AA5, y AA6) (Palacios, 1983).

El aislado LOCAS46 de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola fue identificado molecularmente por medio la secuenciación del 16S ribosomal (16S ARNr) propuesto en el primer esquema de MLST para la tipificación de cepas de *Leptospira* (Ahmed *et al.*, 2006; Carmona-Gasca, 2011), PCR para la detección de leptospirosis patógenas con los iniciadores GI/GII y B64I/B64II y serológicamente mediante la prueba de AM (Myers, 1985; Gravekamp *et al.*, 1993; Castillo-Sánchez, 2008), esta cepa autóctona de probada virulencia en hámster ha sido estudiada

ampliamente en nuestro grupo de investigación desde su aislamiento en el 2004 (Castillo-Sánchez, 2008). Estudios previos de inmunoprotección demostraron que hámsteres inmunizados con GspD<sub>L</sub> recombinante, la supuesta secretina del T2S de *Leptospira borgpetersenii* SV Hardjo (Hardjobovis) resultaron protegidos contra la enfermedad clínica y la muerte, al desafiar a los animales con la cepa LOCaS46 de *L. interrogans* SV Canicola (Rodríguez-Reyes, 2007; Núñez, 2009). El estudio sobre la expresión de antígenos específicos de *Leptospira* con cultivos virulentos de la cepa LOCaS46, demostró que la secretina GspD<sub>L</sub> es expresada durante la infección (Alcaraz-Sosa, 2008). Posteriormente fue secuenciado el locus *gsp* de la cepa LOCaS46 y se comparó con el de la cepa de referencia Hond Utrecht IV, concluyendo que los 17 genes que componen los loci *gsp* tienen una identidad del 99% entre ambas cepas (Ordóñez, 2010). Así mismo, se realizaron las primeras evaluaciones de biológicos comerciales para su uso en perros, mediante la prueba de potencia en hámsteres usando la cepa LOCaS46 (Montes de Oca-Basilio, 2009; Castillo-Sánchez, 2010). En el presente trabajo se utilizó la cepa LOCaS46 en sus formas virulenta y no virulenta (atenuada) para preparar bacterinas y compararlas con la elaborada con la cepa de referencia Hond Utrecht IV.

La norma mexicana para la elaboración de bacterinas empleadas para la prevención y control de la leptospirosis bovina (NOM-038-ZOO-1995) está basada en normas internacionales, las cuales tienen como objetivo evaluar o comprobar la calidad del producto biológico. Dicho control de la calidad se realiza en tres rubros principales: en las materias primas, durante la producción (control del proceso) y al finalizar (control del producto terminado); en los tres casos la pruebas se pueden dividir en dos grandes grupos: pruebas biológicas y pruebas fisicoquímicas (CFR, 2004; OIE, 2004). En este trabajo las bacterinas se evaluaron durante y al final del proceso de producción, mediante las pruebas biológicas de esterilidad y pureza, no detectándose crecimiento en los medios bacteriológicos para microorganismos aerobios (agar sangre y agar Sabouraud) y anaerobios (caldo tioglicolato) después de 21 días de incubación, comprobándose la esterilidad y la ausencia de microorganismos contaminantes, así mismo, la prueba de seguridad o inocuidad en cobayos demostró

que los biológicos no provocaban reacciones indeseables locales o sistémicas cuando se aplicó por lo menos, el doble de la dosis, finalmente se realizó la prueba de potencia en hámsteres. De acuerdo a la normatividad nacional e internacional los biológicos comerciales también deben cumplir con otras pruebas biológicas como titulación, concentración o viabilidad, inmunogenicidad, potencia relativa e interferencia (CFR, 2004; OIE, 2004), además de las pruebas fisicoquímicas que incluyen determinación de humedad, hermeticidad, vacío, determinación de pH, determinación de formol, fenol u otro inactivante o conservador, determinación de proteína, volumen y características físicas generales macroscópicas y microscópicas (CFR, 2004; OIE, 2004). En este trabajo no se realizaron pruebas fisicoquímicas a los biológicos elaborados.

El proceso de elaboración de los biológicos fue similar al reportado en otros trabajos (Srikram *et al.*, 2008), en este estudio se usaron dos diferentes concentraciones  $2.4 \times 10^8$  y  $2.4 \times 10^9$  leptospiras/ml/dosis, esto con base en la normatividad sobre la elaboración de bacterinas contra *Leptospira* existente en México, que trata sobre los requisitos mínimos para la bacterinas empleadas en la prevención y control de la leptospirosis bovina (NOM-038-ZOO-1995).

Como se mencionó con anterioridad, parte de la evaluación de un inmunógeno incluye la prueba de potencia, ésta mide la protección que confiere un inmunógeno a animales inmunizados cuando son desafiados con 10 a 10,000 DL50 del antígeno homólogo, por consiguiente es la capacidad de la bacteria para impedir la muerte del animal. Para realizar esta prueba es indispensable contar con serovariedades virulentas que sean capaces de reproducir la enfermedad en animales de laboratorio. Así mismo, la DL50 se usa para expresar la magnitud de la virulencia de los microorganismos y en general es la menor cantidad de microorganismos que al administrarse por la vía apropiada a un número de animales susceptibles, provoca la muerte de la mitad de éstos (50%) al término de un período dado y se puede expresar de diferentes maneras como microorganismos por dosis, títulos, dilución, unidades arbitrarias, unidades de masa o volumen (toxinas).

En el presente trabajo se estableció la DL50 de la cepa LOCaS46 serovariedad Canicola de *L. interrogans* en 5 microorganismos, Otro estudio establece la DL50 en hámsteres de la cepa Kito de *L. interrogans* serogrupo Canicola aislada a partir de orina de un perro en 3 microorganismos para hembras y 3.3 microorganismos para machos (Silva *et al.*, 2008), demostrando que cada cepa aislada tiene diferente grado de virulencia aún perteneciendo a la misma serovariedad. Con algunas serovariedades que no son letales para el hámster, como Hardjo, la potencia se mide frente a la resistencia a la infección renal cuando los animales son desafiados con 10 a 10,000 DI50 (dosis infectante 50%) o mediante la inducción de un título de anticuerpos adecuado en conejos. Por consiguiente, la DL50 debe ser establecida para cada una de las serovariedades que se van a usar en la prueba de potencia. En el caso de las inmunógenos polivalentes la prueba de potencia se debe de realizar por separado para cada una de las serovariedades incluidas en las preparaciones (CFR, 2004).

Durante el establecimiento de la DL50 se observó que la cepa LOCaS46 produjo una infección letal en los hámsteres ocasionando la muerte de estos dentro de los 9 a 12 días posteriores a la infección, caracterizada por anorexia, emaciación, depresión, postración, debilidad muscular y en algunos casos incoordinación y convulsiones. La lesión macroscópica observada en los 22 animales que murieron en los diferentes grupos fue hemorragias pulmonares severas, lo que concuerda con trabajos previos donde mencionan que la serovariedad Canicola puede causar una enfermedad severa en animales y humanos, caracterizada por hemorragias pulmonares (Trevejo *et al.*, 1998). La cepa LOCaS46 mostró una mayor virulencia a la reportada anteriormente (Castillo-Sánchez, 2008), eso es probablemente debido a los pases sucesivos en hámster, lo que ha permitido que la cepa adapte sus propiedades virulentas a esta especie, razón por la cual se observa un cuadro clínico más agresivo.

La infección por *Leptospira* en los 22 animales de los diferentes grupos que murieron se comprobó mediante el cultivo bacteriológico y la técnica PCR, donde el 100% de los animales que murieron (22) fueron positivos al reaislamiento de *Leptospira*, mientras que la PCR detecto 90.90% de animales positivos (20). Lo que concuerda con trabajos previos donde mencionan que el cultivo bacteriológico tiene una mayor

sensibilidad para aislar al microorganismo a partir de animales infectados experimentalmente. Lo anterior es derivado de las condiciones experimentales aplicadas y no un reflejo de lo que se observa en muestras clínicas, donde el porcentaje de aislamiento en muestras de perros observado en algunos trabajos es del 3.79% (6 aislamientos de 158 individuos) y 8.47% (5 aislamientos de 59 individuos) (Palacios, 1983; Alcaraz-Sosa, 2008; Castillo-Sánchez, 2008).

Una vez que se estableció la DL50 de la cepa LOCaS46 se procedió a realizar la evaluación de los biológicos elaborados mediante la prueba de potencia, utilizando el protocolo descrito en el CFR para la serovariedad Canicola, la prueba de potencia demuestra que animales susceptibles que son inmunizados con una dilución 1/80 de la dosis en un volumen final de 0.25 ml son capaces de sobrevivir sin presentar signos ni lesiones cuando son expuestos al agente patógeno. La prueba se considera satisfactoria si sobrevive por lo menos el 80% de los animales inmunizados y si muere por lo menos el 80% de los animales testigo (no inmunizados) (CFR, 2004).

La prueba de potencia de las cuatro bacterinas, formuladas con una concentración de  $2.4 \times 10^8$  leptospiras/ml no se consideró satisfactoria para ninguno de los biológicos ya que sobrevivieron menos del 80% de los animales inmunizados y desafiados, registrándose en los diferentes grupos una sobrevivencia del 40% (CHU-IV), 50% (CL46-I), 30% (CL46-V) y 0% (CL46-VA), en los grupos testigo (Hidróxido de aluminio y SSF) murieron el 100% de los animales. En contraste la prueba de potencia de las tres bacterinas formuladas con una concentración de  $2.4 \times 10^9$  leptospiras/ml resultó satisfactoria ya que se registró en los diferentes grupos inmunizados una sobrevivencia del 90% (CHU-IV), 100% (CL46-I) y 100% (CL46-V), mientras que en el grupo testigo SSF murió el 100% de los animales. Los resultados obtenidos indican una relación directa entre la concentración del antígeno administrado y la capacidad del hámster inmunizado para sobrevivir a la infección, considerando que el alcance de la respuesta inmunológica a la estimulación antigénica es dependiente en parte, de la cantidad de antígeno administrada (Huhn *et al.*, 1975). Por consiguiente la inmunización fallida también se puede dar porque simplemente la bacterina contenía cantidades insuficientes de antígeno. En un

estudio anterior, concluyeron igualmente al evaluar la potencia de 7 vacunas contra la leptospirosis, que la protección depende de la dosis vacunal y que la eficacia de la vacuna puede ser medida por pruebas de potencia considerando la tasa de sobrevivencia como parámetro relevante (Freudenstein and Hein, 1991).

En este trabajo se cuantificó la respuesta inmune humoral de los animales utilizados en la prueba de potencia, sin embargo, la prueba de inmunogenicidad es la que se utiliza para comprobar que el producto es capaz de estimular una respuesta inmune que pueda ser medida por la presencia de anticuerpos cuando los animales son inmunizados con dosis completas del inmunógeno, por tal razón está orientada a determinar la protección conferida por el inmunógeno a corto y largo plazo en la especie para la que fue preparada, los valores obtenidos en esta prueba son convertidos en expectativas porcentuales de protección y esta debe ser igual o superior al 75% entre tres y cinco semanas después de ser aplicada, la prueba de inmunogenicidad debe mostrar una correlación con las pruebas de titulación y potencia.

La evaluación de la respuesta inmune humoral producida por las diluciones 1/80 de las bacterinas con una concentración de  $2.4 \times 10^8$  leptospiras/ml (CHU-IV, CL46-I, CL46-V y CL46-VA), mostró que los 48 animales inmunizados en los diferentes grupos que murieron después del desafío no presentaron por AM títulos de anticuerpos detectables aun después de la segunda inmunización, mientras que los 12 animales que sobrevivieron mostraron en la cuarta muestra (postdesafío) títulos desde 1:20 hasta 1:2,560 en la prueba de AM, detectándose además anticuerpos de los isotipos IgM e IgG por la prueba de ELISA. Estos animales enfermaron entre el día 7 a 10 postdesafío presentando un cuadro clínico caracterizado por anorexia y depresión, posteriormente mostraron mejoría y al momento de aplicárseles la eutanasia se observaban clínicamente sanos (día 28 postdesafío).

La evaluación de la respuesta inmune humoral producida por las diluciones 1/80 de las bacterinas con una concentración de  $2.4 \times 10^9$  leptospiras/ml (CHU-IV, CL46-I y CL46-V), mostró que el único animal inmunizado con la bacteria CHU-IV que murió después del desafío fue negativo en las pruebas de AM y ELISA para las

cuatro muestras, mientras que de los 29 animales inmunizados que sobrevivieron, solamente 12 mostraron en la prueba de AM títulos desde 1:20 hasta 1:640 en la tercera muestra (después de la segunda inmunización) y los títulos se incrementaron en la cuarta muestra (postdesafío), alcanzando títulos de hasta 1:1,280. La prueba de ELISA detectó anticuerpos de los isotipo IgG para la tercera muestra en 18 individuos y anticuerpos del isotipo IgM e IgG en la cuarta muestra en 29 y 19 individuos respectivamente, los 29 hámsteres sobrevivientes no presentaron signos clínicos de enfermedad durante los 28 días que se observaron posteriores al desafío, no mostraron tampoco lesiones observables a la necropsia compatibles con leptospirosis y resultaron negativos al cultivo y PCR específico para *Leptospira*.

En este estudio, mediante las técnicas de AM y ELISA no se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ) en cuanto a la producción de anticuerpos en los grupos inmunizados con las bacterinas con una concentración de  $2.4 \times 10^9$  leptospiras/ml con respecto al grupo testigo no inmunizado en la segunda muestra de suero (15 días después de la primera inmunización), sin embargo si se observaron diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) por medio de la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos del isotipo IgG en la tercera muestra de suero (15 días después de la segunda inmunización) en los tres grupos inmunizados con respecto al grupo 4 testigo SSF (no inmunizado).

Estos resultados concuerdan con trabajos previos donde mencionan que títulos bajos o indetectables de anticuerpos en suero producidos por la vacunación son suficientes para conferir protección contra la enfermedad clínica y la muerte (Shenberg and Torten, 1973); por consiguiente, la ausencia de títulos de anticuerpos no necesariamente significa que el inmunógeno sea incapaz de estimular al sistema inmune (Adler and Faine, 1977). Sin embargo, también se ha mencionado que existen vacunas protectoras, tanto en animales como en humanos, que generan una respuesta de anticuerpos baja o indetectable según la prueba de AM, demostrando que la protección contra la enfermedad y muerte no está relacionada con títulos de anticuerpos altos (Faine *et al.*, 1999).

El incremento del título de los anticuerpos que se observó después del reto en los animales que sobrevivieron al desafío, es probablemente debido a que la exposición a *Leptospira* funcionó como una dosis de refuerzo, lo cual concuerda con trabajos previos donde mencionan que hembras gestantes de hámster sirio dorado inmunizadas por vía intramuscular con una dosis de la vacuna trivalente anti-*Leptospira* vax-SPIRAL ( $5-8 \times 10^7$  leptospiras/serovariedad (Canicola, Copenhageni y Mozdok adsorbidas en gel de hidróxido de aluminio), mostraron un incremento de anticuerpos después del desafío, obteniendo por medio de la prueba de ELISA títulos recíprocos de 1:50 quince días después de la inmunización y 1:300 quince días después del desafío, mientras que la prueba de AM no evidenció respuesta de anticuerpos aglutinantes usando una dilución de trabajo tan baja como 1:2 (Oliva, *et al.*, 1998).

Trabajos previos, de la misma manera mencionan que hámsteres inmunizados por vía subcutánea con dos dosis de una bacterina elaborada a partir de la serovariedad Autumnalis cepa RY21 de *Leptospira interrogans* ( $10^8$  leptospiras/0.1ml/dosis), fueron capaces de estimular la producción de anticuerpos después de la segunda inmunización, observándose posteriormente un incremento considerable en los títulos de anticuerpos en los animales sobrevivientes al desafío. Además se obtuvo una sobrevivencia del 92% a pesar de que los hámsteres presentaron un cuadro clínico en los primeros 7 días posteriores al desafío y después de tres semanas los signos clínicos desaparecieron. Finalmente concluyen que la vacunación fue insuficiente para prevenir la colonización de los riñones por *Leptospira* (Srikram *et al.*, 2008). Así mismo, las diluciones 1/80 de las bacterinas CHU-IV, CL46-I y CL46-V con una concentración de  $2.4 \times 10^9$  leptospiras/ml fueron más eficientes al evitar la enfermedad clínica, muerte y el estado de portador de los animales inmunizados, a pesar de que se administró una concentración de antígeno menor ( $3 \times 10^7$  leptospiras contenidas en 1/80 de la dosis) en comparación con el trabajo realizado por Srikram y colaboradores.

En otro estudio elaborado en 1980, comparan la capacidad protectora conferida con bacterinas contra *Leptospira interrogans* serovariedad Pomona inactivadas con calor

y formalina, los resultados mostraron que ambas bacterinas protegían a los hámsteres al aplicarlas a una concentración de  $4 \times 10^8$  hasta  $4 \times 10^5$  leptospiras/ml, mientras que concentraciones más bajas de microorganismos no eran protectoras ( $4 \times 10^4$  hasta  $4 \times 10^3$  leptospiras/ml (Adler and Faine, 1980).

En cuanto a la bacterina CL46-VA con hidróxido de aluminio como adyuvante y una concentración de  $2.4 \times 10^8$  leptospiras/ml se esperaba que confiriera protección a los animales inmunizados. Sin embargo, todos ellos murieron, esto se explica en parte porque la dilución 1/80 de los inmunógenos con la misma concentración de microorganismos tampoco protegieron a los animales, además de esto la vía de inmunización también pudo ser un determinante; en este trabajo todas las bacterinas incluyendo la que contenía hidróxido de aluminio como adyuvante (CL46-VA) se administraron por vía subcutánea, sin embargo la FDA menciona que las vacunas que contienen adyuvantes como el hidróxido de aluminio, siempre deberán aplicarse por vía intramuscular profundo y no por vía subcutánea (Tizard, 1996). El hidróxido de aluminio es capaz de producir nódulos persistentes y abscesos locales estériles que se asocian más a la administración subcutánea que a la intramuscular y pueden persistir por un largo periodo de tiempo, estas reacciones pueden ser debidas a un mecanismo irritativo o de depósito, pero en otras ocasiones se ha demostrado un mecanismo de hipersensibilidad tipo IV (Eseverri *et al.*, 2003). La disolución del adyuvante hidróxido de aluminio comienza en el momento de su administración, sin embargo, si este es aplicado por vía intramuscular en veintiocho días solamente el 17% del hidróxido de aluminio se habría disuelto en el líquido intersticial y habría sido absorbido en sangre (Dupuis *et al.*, 1998)

La infección por *Leptospira* en los hámsteres que murieron y la determinación del estado de portador de los animales que sobrevivieron durante las pruebas de potencia se verificó mediante el aislamiento bacteriológico y la técnica de PCR. En la prueba de potencia de las bacterinas con una concentración de  $2.4 \times 10^8$  microorganismos/ml murieron 48 animales dentro de los diferentes grupos (incluyendo los animales de los grupos 5 Testigo adyuvante hidróxido de aluminio y 6 Testigo SSF), lográndose aislar a *Leptospira* en 46 individuos (100% de aislamientos) y detectando por PCR 45

hámsteres positivos (97.82% de positividad). Lo anterior confirma que los animales murieron por leptospirosis; cabe aclarar que no se obtuvieron muestras para el cultivo y PCR de 2 animales. En cuanto a los 12 hámsteres que sobrevivieron al desafío, solo 2 animales que fueron inmunizados con las bacterinas CL46-I y CL46-V se pudieron demostrar como portadores de *Leptospira* (ambos con cultivo positivo y PCR negativo), esto a pesar de que los 12 animales sobrevivientes presentaron un cuadro clínico.

En contraste, en la prueba de potencia de las bacterinas con una concentración de  $2.4 \times 10^9$  leptospiras/ml solo murieron 5 animales dentro de los diferentes grupos (incluyendo los animales del grupo 4 Testigo SSF), lográndose aislar a *Leptospira* en los 5 individuos (100% de aislamientos) y detectándose por PCR 4 hámsteres positivos (80% de positividad). En este estudio los inmunógenos elaborados con  $2.4 \times 10^9$  leptospiras/ml fueron eficaces protegiendo contra la enfermedad clínica y la muerte a los animales inmunizados con 1/80 de la dosis (CHU-IV: 90%; CL46-I: 100% y CL46-V: 100%), así mismo en cuanto a la protección contra el establecimiento del estado de portador (infección de órganos y leptospiuria) también protegieron al 100% de los animales sobrevivientes al desafío en los diferentes grupos, comprobándose mediante el cultivo bacteriológico ya que la ausencia del cuadro clínico en estos animales no excluye por sí solo la posibilidad de que pudieran ser portadores asintomáticos y diseminadores del *Leptospira* a través de la orina.

Finalmente, no se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ) entre ninguno de los biológicos elaborados con la cepa referencia Hond Utrecht IV y la cepa LOCaS46 virulenta y no virulenta con cuentas de  $2.4 \times 10^9$  leptospiras/ml para estas condiciones de reto.

Estos resultados coinciden parcialmente con un trabajo previo, donde compararon la efectividad de bacterinas elaboradas a partir de la cepa de referencia no virulenta Hond Utrecht IV serovariedad Canicola y un aislado virulento cepa Moulton de la misma serovariedad. En este estudio se inmunizaron hámsteres lactantes con una dosis de 1,000, 100, 10 o 1  $\mu\text{g}$  de la bacterina por vía intraperitoneal y 14 días después fueron desafiados, los resultados mostraron que las concentraciones

inmunogénicas de de todas las dosis probadas de la cepa virulenta Moulton protegían a los animales contra la muerte y la infección renal, en cuanto a los animales inmunizados con 1,000, 100 y 10 µg/ml de la cepa no virulenta Hond Utrecht IV quedaron protegidos contra la muerte y la infección renal. Sin embargo la dosis de 1 µg/ml protegió contra la muerte pero no contra la infección renal quedando como portadores 20% de los animales inmunizados (5 de 25 hámsteres), concluyendo que si bien ambas preparaciones demostraron ser poderosos inmunógenos al evitar la enfermedad clínica y la muerte de los animales inmunizados, se observaron variaciones como infecciones renales en los animales que fueron inmunizados con la dosis más baja de la bacterina elaborada con microorganismos avirulentos (cepa Hond Utrecht IV), sugiriendo que la pérdida de virulencia va acompañada de una reducción de inmunogenicidad (Zeigler *et al.*, 1976). Se ha mencionado que la virulencia es una de las características fundamentales que debe presentar una cepa de *Leptospira* para poder ser considerada como posible cepa vacunal, puesto que se ha observado que la protección inducida por cepas no virulentas es menor que la inducida por algunas cepas virulentas (Sonrier *et al.*, 2001). También se ha puntualizado, que la protección cruzada se debe a antígenos proteicos compartidos entre las cepas de los serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae y Autumnalis, estos antígenos son expresados tanto en cepas virulentas como no virulentas, pero las cantidades pueden variar en función de la virulencia de la cepa, demostrando una vez más la importancia de la virulencia en la cepa utilizada para la fabricación de inmunógenos contra *Leptospira* (González *et al.*, 2004)

La duración de la inmunidad conferida por inmunógenos se ve influenciada por varios factores, tales como el proceso de elaboración y manejo de la vacuna, vía de administración, concentración del antígeno, número de refuerzos, intervalo de aplicación entre cada dosis, estado fisiológico del individuo en el momento de la vacunación, variaciones genéticas individuales en la capacidad de respuesta del animal a la vacuna y finalmente el uso de adyuvantes (Ford, 2007). Por lo tanto, la dosis inmunogénica, el tiempo de la inmunización primaria, intervalo entre dosis y tiempo para las inyecciones de refuerzo, se basan en consideraciones teóricas y

experimentos de vacunación. *Leptospira* es un complejo multiantigénico conformado por antígenos serogrupo y serovariedad específicos (como el LPS) y por otros antígenos altamente conservados en la especie o el género (proteínas de membrana externa, PMEs). Tras la inmunización con células completas se genera una respuesta de anticuerpos dirigida a uno y otro tipo de antígenos, aún cuando la fracción predominante de anticuerpos va dirigida a epítopes específicos de serovariedad (LPS) (Midwinter *et al.*, 1990; Levett, 2001). Los anticuerpos contra el LPS son predominantemente IgM, mientras que los anticuerpos contra proteínas son principalmente IgG (Guerreiro *et al.*, 2001), la producción anticuerpos del isotipo IgG específica, es muy variable de un individuo a otro, por lo que su medición no es útil para el diagnóstico, debido a que la mayoría de los anticuerpos presentes en la fase aguda de la leptospirosis son del isotipo IgM (Boza, 1990). La respuesta que monta el organismo ante una primera exposición tarda alrededor de cinco a siete días, alcanzando su punto máximo alrededor de los 14 días posteriores a la exposición, subsecuentemente los anticuerpos comienzan a disminuir, esto es debido al catabolismo natural de los anticuerpos o a su unión al antígeno, con la consiguiente eliminación de la circulación (Stites *et al.*, 1996; Weir and Stewart, 1999). La aplicación de una segunda dosis permite al sistema inmunitario desarrollar una respuesta secundaria muy parecida a la respuesta primaria y no induce maduración de la afinidad (cambio de isotipo de IgM a IgG), esto es debido a que el antígeno inmunodominante de *Leptospira* el LPS es un antígeno timo independiente (Weir and Stewart, 1999).

Se han realizado numerosos trabajos buscando la dosis adecuada para estimular una buena respuesta inmunológica empleando diferentes serovariedades de *Leptospira* y modelos animales, por ejemplo: la bacterina monovalente del serogrupo Ballum de *L. interrogans* elaborada por González y colaboradores contiene  $6 \times 10^8$  células/ml/dosis (González *et al.*, 2005), la bacterina de la serovariedad Autumnalis cepa RY21 de *L. interrogans* contiene  $10^8$  células/0.1ml/dosis (Srikram *et al.*, 2008), mientras que Adler y colaboradores elaboraron una bacterina de la serovariedad Pomona experimentando con diferentes concentraciones del inmunógeno desde  $4 \times 10^3$  hasta

$4 \times 10^8$  células/ml/dosis (Adler and Faine, 1980). Inclusive para aquellas preparaciones polivalentes como la utilizada por Oliva y colaboradores, la cual incluye las serovariedades Canicola, Copenhageni y Mozdok utilizan una concentración de 5 a  $8 \times 10^7$  células/serovariedad/0.5 ml/dosis (Oliva *et al.*, 1998). Otros trabajos evalúan la eficacia, estado de portador renal y duración de la inmunidad en perros conferida con biológicos comerciales, sin embargo no mencionan la concentración del leptospiras que contienen por dosis (André-Fontaine *et al.*, 2003; Klaasen *et al.*, 2003; Schreiber *et al.*, 2005). Por tal razón existe una gran diversidad de criterios sobre la elaboración de protocolos de inmunización así como de la concentración de antígeno, tanto en biológicos destinados para fines de investigación como para productos comerciales; sin embargo, estos estudios coinciden en que la utilización de bacterinas de células completas confiere una inmunidad de corta duración y es serogrupo/serovariedad específica, por consiguiente las investigaciones futuras deberán enfocarse hacia la caracterización de antígenos proteicos adicionales como potenciales candidatos para vacunación.

## 8 CONCLUSIONES

La prueba de potencia de las bacterinas con una concentración de  $2.4 \times 10^8$  leptospiras/ml (CHU-VI, CL46-A, CL46-V y CL46-VA), no se consideró satisfactoria para ninguna de los biológicos, ya que éstas no fueron capaces de evitar la muerte de por lo menos el 80% de los animales inmunizados, así como tampoco impidieron la enfermedad clínica y el estado de portador renal de los animales que sobrevivieron al desafío.

En los animales inmunizados con las bacterinas con cuentas de  $2.4 \times 10^8$  microorganismos/ml no se observó seroconversión por la prueba de AM, ni se detectaron anticuerpos por la prueba de ELISA aun después de la segunda inmunización.

La prueba de potencia de las bacterinas con una concentración de  $2.4 \times 10^9$  leptospiras/ml (CHU-VI, CL46-A y CL46-V), si se consideró satisfactoria para los tres bacterinas, ya que éstas fueron capaces de evitar la muerte en más del 90% de los animales inmunizados, así como impedir la enfermedad clínica y el estado de portador renal en el 100% de los animales inmunizados que sobrevivieron al desafío.

No se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ) en cuanto a la protección conferida con las bacterinas elaboradas a partir de la cepa LOCaS46 (virulenta y avirulenta) y la cepa de referencia Hond Utrecht IV con una concentración de  $2.4 \times 10^9$  microorganismos/ml para estas condiciones de reto.

La concentración de microorganismos fue determinante en los resultados obtenidos, por lo que se deben realizar ensayos para buscar la dosis inmunogénica de la cepa LOCaS46 y poder comprobar que esta cepa es capaz de estimular una respuesta inmune que se pueda ser medida por la presencia de anticuerpos en los animales inmunizados.

Es importante contar con aislados autóctonos virulentos de *Leptospira* que hayan sido bien identificados y caracterizados, con el fin de poder realizar la prueba de potencia para la constatación de biológicos comerciales o su posible inclusión en biológicos o para su uso en el diagnóstico de la enfermedad.

## 9 BIBLIOGRAFÍA

1. Adler B. International committee on systematics of prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of Leptospiraceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011;61:698-699.
2. Adler B, De la Peña-Moctezuma A. *Leptospira* and Leptospirosis. *Vet Microbiol* 2010;140:287-296.
3. Adler B, Faine S. Serological and protective antibody responses of rabbits to leptospiral antigens. *J Med Microbiol* 1978;11:401-409.
4. Adler B, Faine S, Muller HK, Green DE. Maturation of humoral immune response determines the susceptibility of guinea-pigs to leptospirosis. *Pathology* 1980;12:529-538.
5. Adler B, Faine S. Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral infections. *Infect Immun* 1977;17:67-72.
6. Adler B, Faine S. Immunogenicity of boiled compared with formalized leptospiral vaccines in rabbits, hamsters and humans. *J Hyg* 1980;84:1-10.
7. Ahmed N, Devi SM, Valverde ML, Vijayachari P, Machangu RS, Ellis WA, Hartskeerl RA. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrobials* 2006;23:28-37.
8. Al-Shakshir RH, Regnier FE, White JL, Hem SL. Contribution of electrostatic and hydrophobic interactions to the adsorption of proteins by aluminium containing adjuvants. *Vaccine* 1995;13:41-44.
9. Alcaraz-Sosa LE. Detección de la expresión de la secretina GSPD<sub>L</sub> del sistema de secreción de *Leptospira*, mediante inmunohistoquímica (tesis de maestría). México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México, 2008.
10. Amatredjo A, Campbell RSF. Bovine leptospirosis. *Vet Bull (Commonwealth Bureau Animal Hlth)* 1975; 43:875-891.

11. Anderson DL, Johnson RC. Electron microscopy of immune disruption of leptospire: action of complement and lysozyme. *J Bacteriol* 1968;95:2293-2309.
12. André-Fontaine G. Canine leptospirosis. Do we have a problem?. *Vet Microbiol* 2006;117:19-24.
13. André-Fontaine G, Branger C, Gray AW, Klaasen HLB. Comparison of the efficacy of three commercial bacterins in preventing canine leptospirosis. *Vet Rec* 2003;153:165-169.
14. Arroyo S. Identificación de leptospiras en perros de la Ciudad de México; método serológico y método biológico (tesis de licenciatura). México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México, 1966.
15. Auran NE, Johnson RC, Ritzi DM. Isolation of the outer sheath of *Leptospira* and its immunogenic properties in hamsters. *Infect Immun* 1972;5:968-975.
16. Babiuk LA, Babiuk SL, Loehr BI, van Drunen Littel-van den H. Nucleic acid vaccines: research tool or commercial reality. *Vet Immunol Immunopathol* 2000;76: 1-23.
17. Babudieri B. The morphology of the genus *Leptospira* as shown by the electron microscope. *J Hyg* 1949;47:390-392.
18. Babudieri B, Castelli M, Risoni F. Comparative tests with formalized and irradiated vaccines against leptospirosis. *Bull WHO* 1973;48:587-590.
19. Barbosa AS, Abreu PE, Vasconcellos SA, Morais ZM, Goncales AP, Silva AS *et al.* Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human complement regulator C4BP. *Infect Immun* 2009;77:1137-1143.
20. Barnett JK, Barnett D, Bolin CA, Summers TA, Wagar EA, Cheville NF, *et al.* Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. *Infect Immun* 1999;67:853-861.
21. Bennet B, Check IJ, Olsen MR, Hunter RL. A comparison of commercially available adjuvants for use in research. *J Immunol Methods* 1992;153:31-40.
22. Bernard W. Leptospirosis. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1993;9:435-444.

23. Bey RF, Johnson RC. Leptospiral vaccines: immunogenicity of protein-free medium cultivated whole cell bacterins in swine. *Amer J Vet Res* 1983;44:2299-2301.
24. Bolin CA, Cassells JA, Zuerner RL, Trueba G. Effect of vaccination with a monovalent *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis vaccine on type hardjo-bovis infection of cattle. *Amer J Vet Res* 1991;52:1639-1643.
25. Bolin CA, Zuerner RL, Trueba G. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine containing *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis on type hardjo-bovis infection of cattle. *Amer J Vet Res* 1989;50:2004-2008.
26. Boza R. Leptospirosis anicérica: Análisis de una epidemia en Costa Rica. *Acta Med Cost* 1990;32:74-80.
27. Bramel RG, Scheidy SF. The effect of revaccination of horses and cattle with *Leptospira pomona* bacteria. *J Am Vet Med Assoc* 1956;128:399-400.
28. Branger C, Chatrenet B, Gauvrit A, Aviat F, Aubert A, Bach JM, Andre-Fontaine G. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. *Infect Immun* 2005;73:4062-4069.
29. Branger C, Sonrier C, Chatrenet B, Klonjkowski B, Ruvoen-clovet N. Identification of the haemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *L. interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. *Infect Immun* 2001;69:6831-6838.
30. Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies (Part 2). *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:839-858.
31. Broom J. The protective value of Leptospiral vaccines in hamsters. *Vet Rec* 1949;11:127-130.

32. Brown AL, Jensen JH, Creamer AA, Scheidy SF. Evaluation of a *Leptospira* bacterin prepared in culture medium. *Vet Med* 1955;50:167-171.
33. Brunner KT, Meyer KF. Immunization of hamsters and dogs against experimental leptospirosis. *J Immun* 1950;64:365-372.
34. Bulach DM, Kalambaheti T, De la Peña-Moctezuma A, Adler B. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Leptospira*. *J Mol Microbial and Biotechnology* 2002;2:376-380.
35. Cárdenas RV, Torres RN, Duarte L, Alemán SR, Lazo PL. Primer aislamiento en Cuba de *Leptospira interrogans* Icterohaemorrhagiae en ovinos. *Revista Electrónica de Veterinaria* 2010;11:1-3.
36. Carmona-Gasca CA. Evaluación de gspD para la tipificación de aislados de *Leptospira* mediante la secuenciación de Locus Múltiples (MLST) (tesis de doctorado). México, DF. Universidad Nacional Autónoma de México, 2011.
37. Carneiro M, Giacomini ML, Costa JM. Leptospirosis asociada a la exposición ocupacional: Estudio clínico y epidemiológico. *Rev Chil Infect* 2004;21:339-344.
38. Castillo-Sánchez LO, Ramírez-Ortega JM, Carmona-Gasca CA, De la Peña-Moctezuma A. Desarrollo de un modelo de infección experimental en hámsteres con una cepa virulenta de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola. Memorias de la Reunión Nacional de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Forestal en México. San Francisco de Campeche, México, 2010.
39. Castillo-Sánchez LO. Detección de perros portadores de leptospiras patógenas: Estudios bacteriológico, serológico, histopatológico y molecular (tesis de licenciatura). México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México, 2008.
40. CFR, Code of Federal Regulations. Animal plant health inspection service, USDA United States Department of Agriculture. US Government Printing Office, Washington 2004.
41. Claire HF, Van HGJ. Laboratory animal medicine. Biology and diseases of hamsters. Academi Press, 2002.

42. Cousins DV, Ellis TM, Parkinson J, McGlashan CH. Evidence for sheep as a maintenance host for *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Vet Rec* 1989;124:123-124.
43. Cui Z. DNA vaccine. *Adv Genet* 2005;54:257-289.
44. Chávez-Trejo R. Análisis de los resultados obtenidos en el diagnóstico serológico de leptospirosis en animales, de 1989 a 2004 en el Departamento de Microbiología e Inmunología, FMVZ-UNAM (tesis de licenciatura). México DF: Universidad Nacional Autónoma de México, 2006.
45. Chen TZ. Development and present status of leptospiral vaccine and technology of production of the vaccine in China. *Ann Immunol Hungar* 1986;26:125-151.
46. Dai B, You Z, Chen Z, Yan H, Fang Z. Protection against leptospirosis by immunization with plasmid DNA encoding 33 kDa endoflagellin of *L. interrogans* serovar Lai. *Chin Med Sci J* 2000;15:14-19.
47. Dai B, You Z, He P, Wang M, Wang Y. Analysis of cpG motif in endoflagellar gene and expression vector of Leptospiral DNA vaccine. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2003;34:1-4.
48. De Brito T, Prado MJ, Negreiros VA, Nicastrí AL, Sakata EE, Yasuda PH, Santos RT, *et al.* Detection of leptospiral antigen (*Leptospira interrogans* serovar Copenhageni serogroup Icterohaemorrhagiae) by immunoelectron microscopy in the liver and kidney of experimentally infected guinea-pig. *Int J Exp Pathol* 1992;73:633-642.
49. De la Peña-Moctezuma A, Bulach DM, Kalambaheti T, Adler B. Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* subtype Hardjobovis. *FEMS Microbiol Lett* 1999;177:319-326.
50. Del Real G, Segers R, Van der Zeijst B, Gaastra W. Cloning of a hemolysin gene from *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Infect Immun* 1989;57:2588-2590.

51. Dupuis M, Murphy TJ, Higgins D, Ugozzoli M, Van Nest G, Ott G, McDonald DM. Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection. *Cell Immunol* 1998;186:18–27.
52. Dwyer AE, Crockett RS, Kalsow C. Association of leptospiral seroreactivity and breed with uveitis and blindness in horses: 372 cases (1986-1993). *J Am Vet Med Assoc* 1995;207:1327-1331.
53. Dysko RC, Nemzek JA, Levin SI, DeMarco GJ, Moalli MR. *Biology and Diseases of Dogs. Laboratory animal medicine* 2002.
54. Ebensen T, Schulze. K, Riese P, Morr M, Guzman CA. The bacterial second messenger cdiGMP exhibits promising activity as a mucosal adjuvant. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14:952-958.
55. Ellis W. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1994;3:463-478.
56. Ellis WA, Hovind-Hougen K, Müller S, Birch-Andersen A. Morphological changes upon subculturing of freshly isolated strains of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg Abt I Orig A* 1983;255:323-335.
57. Ellis WA, McParland PJ, Bryson DG. Isolation of leptospire from the genital tract and kidneys of aborted cows. *Vet Rec* 1986a;118:294-295.
58. Ellis WA, Michna SW. Experimental leptospiral abortion in cattle. *Vet Rec* 1974;94:255.
59. Ellis WA, O'Brien JJ, Cassells J. Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype hardjo infection in Northern Ireland. *Vet Rec* 1981;108:555-557.
60. Ellis WA, Songer JG, Montgomery J, Cassells JA. Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar hardjo in the genital and urinary tracts of non-pregnant cattle. *Vet Rec* 1986b;118:11-13.
61. Eseverri JL, Ranea S, Marin A. Reacciones adversas a vacunas. *Allergol et Immunopathol* 2003;31:125-138.

62. Faine S. Leptospirosis. In: Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases. Principles and Practice. Balows A, Hausler WJ, Lennette EH, Ohashi MA, Turano A, editors. New York, Springer-Verlag, 1988:344-352.
63. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and Leptospirosis. 2da ed. Melbourne, Australia, MediSci,1999.
64. Faine S, Adler B, Ruta G. A mechanism of immunity to leptospirosis. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1974;52:301-310.
65. Felix R. Contribución al conocimiento de la incidencia de la leptospirosis (*L. canicola* y *L. icterohaemorrhagiae*) en perros del DF (tesis de licenciatura). México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México, 1963.
66. Fish NA, Kingscote B. Protection of gilts against leptospirosis by use of a live vaccine. *Can Vet J* 1973;14:12-15.
67. Ford R. Vacunación canina. Tratado de medicina interna veterinaria. Ettinger SJ, Elsevier Saunders, 2007.
68. Francois S, Gualtiere C, Drab S, Creixell B, Capelletti G, Anthony I. Serological study after vaccination against leptospirosis in pigs. *Veterinaria Argentina* 1995;12:530-533.
69. Freudenstein H, Hein B. Potency of leptospiral vaccines and protection against chronic infection in golden hamsters. *Comp Immunol Microbiol Infect Diseases* 1991;14:229-234.
70. Fukumura K. Epidemiological studies on leptospirosis in Okinawa. Part 1. Prevalence of leptospirosis in Izena Island and the prevention by vaccination. *Yamaguchi Medical Journal* 1984;33:257-268.
71. Galloway RL, Levett NP. Evaluation of a Modified Pulsed-Field Gel Electrophoresis Approach for the Identification of *Leptospira* serovars. *Am J Trop Med Hyg* 2008;78:628-632.
72. Gerritsen MJ, Koopmans MJ, Dekker TC, De Jong MC, Moerman A, Olyhoek T. Effective treatment with dihydrostreptomycin of naturally infected cows shedding *Leptospira interrogans* serovar hardjo subtype hardjobovis. *Am J Vet Res* 1994;55:339-343.

73. Goldsby RA, Kindt TJ. *Inmunología*. México DF, Mc Graw-Hill Interamericana 2004.
74. González A, Rodríguez Y, Batista N, Valdés Y, Núñez JF, *et al.* Inmunogenicidad y capacidad protectora en hamsters de vacunas antileptospirósicas monovalentes de células enteras del serogrupo Ballum. *Rev Argentina de Microbiología* 2005;37:169-175.
75. González M, Batista N, Machado M, Savournin O, Saltarén A, Sanamé A, *et al.* Caracterización de cepas de *Leptospira* Ballum aisladas de casos clínicos. Inmunidad cruzada en hámsteres vacunados con vax-SPIRAL. *Biología Aplicada* 2004;21:77-81.
76. Greene CE. *Enfermedades infecciosas en perros y gatos*. 2da ed. Philadelphia: WB Saunders Company 1998.
77. Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, Van Eys GJ, Everard CO, Hartskeerl RA, Terpstra WJ. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol* 1993;139:1691-1700.
78. Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Maxel M, Matsunaga J, Galvao RM. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun* 2001;69:4958-4968.
79. Guerrero J, Gattas CR. Immunomodulating substances: an overview. *Rev Microbiol* 1982;13:110-115.
80. Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, *et al.* The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* 2000;68:2276-2285.
81. Haake DA, Mazel MK, McCoy AM, Milward F, Chao G, Matsunaga J, *et al.* Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun* 1999;67:6572-6582.
82. Hartman EG. Epidemiological aspects of canine leptospirosis in the Netherlands. *Zentralbl Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene Abteilung I Originalreihe A* 1984;258:350-359.

83. Hartman EG, Van Houten M, Van der Donk JA, Frik JF. Serodiagnosis of canine leptospirosis by solid phase enzyme linked immunosorbent assay. *Vet Immunol Immunopathol* 1984;7:33-42.
84. Heath SE, Johnson R. Leptospirosis. *J Am Vet Med Ass* 1994;205:1518-1523.
85. Hilgers LAT, Platenburg PLI, Luitjens A, Groenveld B, Dazelle T, Ferrari-Laloux M, *et al.* A novel nonmineral oil-based adjuvant. I. Efficacy of a synthetic sulfated polysaccharide in a squalene-in water emulsion in laboratory animals. *Vaccine* 1994;12:653-660.
86. Hodges RT, Young GW, Thomson JT. The efficacy of a leptospirosis vaccine in preventing leptospirosis in pigs. *N Z Vet J* 1985;33:31-34.
87. Hodgins EC, Miller DA, Lozano F. *Leptospira* abortion in horses. *J Vet Diagn Invest* 1989;1:283-287.
88. Hogan PM, Bernard WV, Kazakevicius PA, Fitzgerald MR. Acute renal disease due to *Leptospira interrogans* in a weanling. *Equine Vet J* 1996;28:331-333.
89. Hong-Liang Y, Xu-Cheng J, Xiang-Yan Z, Wen-Jun LI, Bao-Yu HU, Guo-Ping Z, *et al.* Thrombocytopenia in the experimental leptospirosis of guinea pig is not related to disseminated intravascular coagulation. *BMC Infectious Diseases* 2006;6:19
90. Hubert WT, Miller JN. Studies in experimental leptospirosis. The immunogenicity of *Leptospira icterohaemorrhagiae* attenuated by gamma irradiation. *J Immunol* 1965;95:759-764.
91. Huhn RG, Baldwin CD, Cardella MA. Immunity to leptospirosis: Bacterins in dogs and hamsters. *Am J Vet Res* 1975;36:71-74.
92. Hunter R. Overview of vaccine adjuvants: present and future. *Vaccine* 2002; 20:S7-S20.
93. Iagovkin EA, Kostina NI, Vachaev BF, Romantsova T, Kondratenko VF, Bunin IE, *et al.* The improvement of immunobiological preparations against leptospirosis. An experimental study of a new concentrated purified vaccine

- against icterohemorrhagic leptospirosis for human immunization. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1990;2:47-51.
94. Isogai E, Isogai H, Fujii N, Oguma K. Biological effects of leptospiral lipopolysaccharide in mouse B, T and NK cells. *Japan J Vet Sci* 1990a;52:923-930.
  95. Isogai E, Isogai H, Fujii N, Oguma K. Macrophage activation by leptospiral lipopolysaccharide. *Zentralbl Bakteriol* 1990b;273:200-208.
  96. Johnson AG, Gaines S, Landy M. Studies on the O antigen of *Salmonella typhosa*. V. Enhancement of antibody response to protein antigens by the purified lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1956;103:225-246.
  97. Jost BH, Adler B, Faine S. Experimental immunisation of hamsters with lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans*. *J Med Microbiol* 1989;29:115-120.
  98. Kenzy SG, Gillespie R, Lee JH. Comparison of *Leptospira pomona* bacterin and attenuated live culture vaccine for control of abortion in cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1961;139:452-454.
  99. Kingscote B. Isolation of a hamster lethal strain of *Leptospira Hardjo*. *Can Vet J* 1980;21:266.
  100. Kitaoka M, Inoue S. Standard procedures of Weil's disease vaccine and Weil's disease and Akiyami combined vaccine. *Jpn Med J* 1952;1478:2845-2847.
  101. Klaasen HL, Molkenboer MJ, Vrijenhoek MP, Kaashoek MJ. Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. *Vet Microbiol* 2003;95:121-132.
  102. Koizumi N, Watanabe H. Leptospirosis vaccine: Past, present and future. *J Postgrad Med* 2005;51:210-214.
  103. Leal CC, García SR, González FE, Fuentes AJ, *et al.* Risk factors and the prevalence of leptospirosis infection in a rural community of Chiapas, México. *Epidemiol Infect* 2003;131:1149-1156.

104. Lee SH, Kim S, Park SC, Kim MJ. Cytotoxic activities of *Leptospira interrogans* hemolysin SphH as a pore-forming protein on mammalian cells. *Infect Immun* 2002;70:315-322.
105. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:296-326.
106. Levett PN, MR, Galloway RL, Steigerwalt AG. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;56: 671-673.
107. Lezama A. Importancia del Complemento. *Rev Med Vallejana* 2007;4:68-78.
108. Lin YP, Chang Y. Lig proteins the mediate attachment of *Leptospira* to the host cells to initiate infection. 5th Meeting of the International Leptospirosis Society; 2007 september 17-20; Quito, Ecuador.
109. Liu MA, Ulmer JB. Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. *Adv Genet* 2005;55:25-40.
110. López PM, Ortega SC, Atilano LD, De la Peña-Moctezuma A. Detección de anticuerpos contra *Leptospira interrogans* en equinos dedicados a la producción de sueros hiperinmunes. *Vet Méx* 1998;29:173-179.
111. Luna AMA, Moles CPL, Gavaldón RD, Nava VC, Salazar GF. La leptospirosis canina y su problemática en México. *Rev Salud Anim* 2008;30:1-11.
112. Macedo A. Estudio ultraestructural de *Leptospira biflexa* serovar Andamana cepa JNS al microscopio electrónico de transmisión y barrido. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 2005;4:22-27.
113. Martínez R, Pérez A, Quiñones MC, Cruz R, Álvarez A, Armesto M, Fernández C, *et al.* Eficacia y seguridad de una vacuna contra la leptospirosis humana en Cuba. *Rev Panam Salud Pública* 2004;4:249-255.
114. Martínez SR, Cruz de La Paz R, López AC. Algunas consideraciones sobre el comportamiento de la leptospirosis humana en Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 1993;45:32-41.
115. Matsunaga J, Barochi MA, Croda J, Young TA, Sanchez Y, Siqueira I, *et al.* Pathogenic *Leptospira* species express surface exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin family. *Mol Microbiol* 2003;49:929-945.

116. Matsuo K, Isogai E, Araki Y. Control of immunologically crossreactive leptospiral infection by administration of lipopolysaccharides from a nonpathogenic strain of *Leptospira biflexa*. *Microbiol Immunol* 2000;44:887-890.
117. May JC, Progar J, Chin R. The aluminium content of biological products containing aluminium adjuvants: determination by atomic absorption spectrometry. *J Biol Stand* 1984;12:175-183.
118. Meri T, Murgia R, Stefanel P, Meri S, Cinco M. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospiras. *Microb Pathog* 2005;39:139-147.
119. Merien F, Baranton G, Perolat P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. *Infect Immun* 1997;65:729-738.
120. Michna S. Leptospirosis. *Vet Rec* 1970;86:484-496.
121. Midwinter A, Faine S, Adler B. Vaccination of mice with lipopolysaccharide (LPS) and LPS-derived immuno-conjugates from *Leptospira interrogans*. *J Med Microbiol* 1990;33:199-204.
122. Miller DA, Wilson MA, Owen WJ, Beran GW. Porcine leptospirosis in Iowa. *J Vet Diagn Invest* 1990;2:171-175.
123. Montes de Oca-Basilio V. Trabajo profesional Microbiología. México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México, 2009.
124. Morales E. Estudio serológico y aislamiento de *Leptospira interrogans* spp en perros destinados para las practicas de anatomía II (tesis de licenciatura). Toluca, México: Universidad Autónoma del Estado de México, 2004.
125. Morris QH, Martínez MC, Abdala DR, Campos OD. Adyuvantes inmunológicos. *Rev Cubana Invest Biomed* 1999;18:130-137.
126. Morrison WI, Wright NG. Canine leptospirosis: an immunopathological study of interstitial nephritis due to *Leptospira canicola*. *J Pathol* 1976;120:83-89.
127. Myers M. Manual para el diagnostico de laboratorio de la leptospirosis OPS, Centro Panamericano de Zoonosis 1985. Nota técnica No. 30.

128. Naiman BM, Alt D, Bolin CA, Zuerner R, Baldwin CL. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gammadelta T lymphocytes. *Infect Immun* 2001;69:7550-7558.
129. Nally JE, Chantranuwat C, Wu XY, Fishbein MC, Pereira MM, Da Silva JJ, *et al.* Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. *Am J Pathol* 2004;164:1115-1127.
130. NOM-038-ZOO-1995. Requisitos mínimos para las bacterinas empleadas en la prevención y control de la leptospirosis bovina. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Diario Oficial de la Federación 1995.
131. NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Diario Oficial de la Federación 2001.
132. Nomura S, Kishie B, Yoshikawa H, Noro M, Sakurai N, Akatsuka Y, *et al.* Case reports on Weil's disease in Kumano district, Mie prefecture and vaccination. *Media Circle* 1971;140:16-25.
133. Núñez CG. Establecimiento de un ensayo de inmunoprotección basado en rGspD de *Leptospira borgpetersenii* (Hardjobovis) en hámsteres (tesis de maestría). México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México, 2009).
134. OIE. Principles of veterinary vaccine production. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Office International des Epizooties OIE. Paris, France, 2004.
135. Oliva R, Infante JF, González M, Pérez P, Naranjo M, *et al.* Estudio de protección con vax-SPIRAL en grupos (madre-cría) de hámsters sirio dorado. *VacciMonitor* 1998;12.
136. OMS-OPS. Guía de procedimientos técnicos y operacionales para el diagnóstico, tratamiento, vigilancia y control de la leptospirosis en Venezuela. Venezuela, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Organización Mundial de la Salud. Organización Panamericana de la Salud 1999.

137. Ordóñez LL. Comparación de la organización genética de los Loci *gsp* en 2 cepas de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola (tesis de maestría). México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México, 2010.
138. Palacios A. Aislamiento de *Leptospira* spp., Determinación de niveles de anticuerpos específicos y estudio histopatológico de riñones de perros del D.F. (tesis de licenciatura). México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México, 1983.
139. Palacios J. Determinación de niveles de anticuerpos específicos y estudio histopatológico de riñones en perros del D.F. (tesis de licenciatura). México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México, 1983.
140. Palaniappan RU, Chang YF, Hassan F, McDonough SP, Pough M. Expression of Ig like protein by *L. interrogans*. J Med Microbiol 2004;53:975-984.
141. Poonacha KB, Donahue JM, Giles RC, Hong CB, Petrites-Murphy MB, Smith BJ, *et al.* Leptospirosis in equine fetuses, stillborn foals, and placentas. Vet Pathol 1993;30:362-369.
142. Prescott JF, McEwen B, Taylor J, Woods JP, Abrams-Ogg A, Wilcock B. Resurgence of leptospirosis in dogs in Ontario: recent findings. Can Vet J 2002;43:955-961.
143. Radostits OM, Gay CC. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 8va ed. McGraw-Hill Interamericana, 1999.
144. Ramírez-Ortega JM. Diagnóstico de leptospirosis en cerdos de abasto mediante la utilización de las técnicas serológica, bacteriológica, histopatológica y molecular (tesis de licenciatura). México DF: Universidad Nacional Autónoma de México, 2008.
145. Randall R, Cooper HA. The golden hamster (*Cricetus auratus*) as a test animal for the diagnosis of leptospirosis. Science 1944;100:133-134.
146. Rao RS, Gupta N, Bhalla P, Agarwal SK. Leptospirosis in India and the rest of the world. Brazilian J Infect Dis 2003;7:178-193.
147. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am J Hyg 1938;27:493-497.

148. Rentko VT, Clark N, Ross LA, Schelling SH. Canine leptospirosis. A retrospective study of 17 cases. *J Vet Intern Med* 1992;6:235-244.
149. Rivera FA, Roa RM, Ordóñez BM, De la Peña-Moctezuma A. Seroprevalencia de leptospirosis en perros callejeros del norte de la ciudad de México. *Vet Mex* 1999;30:105-107.
150. Rodríguez-Reyes EA. Antigenicidad de la proteína de membrana externa GspD<sub>L</sub> la supuesta secretina del T2SS de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo Hardjobovis (tesis de doctorado). México DF, Universidad Nacional Autónoma de México 2007.
151. Roitt I. Inmunología. Madrid, España, Harcourt Brace 1997.
152. Rojas-Espinosa O. Inmunología. México DF, Editorial Médica Panamericana 2006.
153. Rosenstein S. Prontuario de especialidades veterinarias. México, DF, Ediciones PLM, 2005.
154. Rossetti CA, Vanasco BN, Pini N, Carfagnini JC. Comparison of three diagnostic techniques for the detection of leptospires in the kidneys of wild house mice (*Mus musculus*). *Pesq Vet Bras* 2004;24:6-10.
155. Sánchez-Mejorada P. La leptospirosis canina en México: serovariedades predominantes (tesis de licenciatura). México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México, 1992.
156. Schreiber P, Martin V, Najbar W, Sanquer A, Gueguen S, Lebreux B. Prevention of renal infection and urinary shedding in dogs by a *Leptospira* vaccination. *Vet Microbiol* 2005;108:113-118.
157. Shang ES, Exner MM, Summers TA, Martinich C, Champion CI, Hancock RE, *et al.* The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. *Infec Immun* 1995;63:3174-3181.
158. Shang ES, Summers TA, Haake DA. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infec Immun* 1996;64:2322-2330.

159. Shenberg E, Torten M. A new leptospiral vaccine for use in man. I. Development of a vaccine from "*Leptospira*" grown on a chemically defined medium. *J Infect Diseases* 1973;128:642-646.
160. Silva EF, Santos CS, Athanazio DA, Seyffert N, Seixas FK, Cerqueira GM, *et al.* Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. *Vaccine* 2008;26:3892-3896.
161. Smith CR, Ketterer PJ, McGowan MR, Corney 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.
162. Somenovich VN, Polotskii IE, Dieter AB, Kleirnerman AS. Characteristics of the interaction of *Leptospira* with the host organism in the infective process in golden hamsters. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1988;3:76-82.
163. Sonrier C, Branger C, Michel V, Ruvoën-Clouet N, Ganière JP, André-Fontaine G. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. *Vaccine* 2001;19:86-94.
164. Srikram A, Wongratanacheewin S, Paupairoj A, Wuthiekanun V, Sermswan RW. Analyses of vaccination protocols for *Leptospira interrogans* serovar Autumnalis in Hamsters. *Am J Trop Med Hyg* 2008;79:779-786.
165. Srivastava S. Properties of lipopolysaccharide antigen of *Leptospira interrogans* serovar Pyrogenes. *Indian Vet J* 2002;79:1201-1202.
166. Srivastava SK. Prospects of developing leptospiral vaccines for animals. *Indian J Med Microbiol* 2006;4:331-336.
167. Stites DP, Terr AI, Parslow TG. *Inmunología básica y clínica*. México DF, Manual Moderno 1996.
168. Straw BE, Maclachlan NJ, Cobertt WT, Carter PB, Schey HM. Comparison of tissue reactions produced by *Haemophilus pleuropneumoniae* vaccines made with six different adjuvants in swine. *Can J Comp Med* 1985;49:149-151.
169. Thiermann A. Isolation of leptospire in diagnosis of leptospirosis. *Mod Vet Pract* 1984;65:758-759.

170. Timoney JF, Gillespie JH, Scout FW, Barlough JE. Hagan and Bruner's Microbiology and Infections. Diseases of Domestic Animals, 8va ed. Cornell university Press, 1988.
171. Tizard IR. Inmunología Veterinaria. 5ta ed. McGraw-Hill Interamericana, 1996.
172. Torten M, Shenberg E, Gerichter CB, Neuman P, Klingberg M. A new leptospiral vaccine for use in man. II. Clinical and serologic evaluation of a field trial with volunteers. J Infect Dis 1973;128:647-651.
173. Trevejo RT, Rigau-Pérez JG, Ashford DA, McClure EM, Jarquin-Gonzalez C, Amador JJ, *et al.* Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. J infect Dis 1998;178:1457-1463.
174. Tripathy DN, Hanson LE, Barten SL, Mayer GD, Jones FC 3<sup>rd</sup>. Variation in response of hamsters to Hebdomadis group of *Leptospira*. Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc 1997;81:183-195.
175. Ulmer JB, Wahren B, Liu MA. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. Trends Mol Med 2006;12:216-222.
176. Van der Hoeden J. Epizootology of leptospirosis. Adv Vet Sci 1958;4:277-339.
177. Varela M. Investigación de aglutininas para *Leptospira Icterohaemorrhagiae*, *Canicola* y *Pomona* en sueros humanos y de animales en varios estados de México. Rev Inst Enfer Trop SSA 1959;2:203-204.
178. Veien NK, Hattel T, Justesen O, Norholm A. Aluminium allergy. Contact Dermatitis 1986;15:295-297.
179. Wagnerová J, Ferencík M. Secretory and regulatory products of macrophages in the immune and inflamatory reactions. Biol Bratislav 1993;48:709-717.
180. Wakamatsu A, Pagano LS, Gayotto LC, Santos RT, Sakata EE, Kanamura CT, *et al.* Microscopia optica de alta resolucao: adaptacao do metodo e sua aplicacao ao estudo da leptospirose experimental em cobaias. (High resolution light microscopy: adaptation of the method and its use in the study of experimental leptospirosis in guinea pigs.). Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo 1990;45:47-52.

181. Wang M, Dai B, You Z, Fang Z, Wang Y. Construction of DNA vaccine including a chimeric gene encoding flagellin and outer membrane protein antigen from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Hua Xi Yike Daxue Xue Bao* 2002;33:169-171.
182. Wang Z, Yuan Z, Matsumoto M, Hengge UR, Chang YF. Immune responses with DNA vaccines encoded different gene fragments of severe acute respiratory syndrome coronavirus in BALB/c mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;327:130-135.
183. Weir DM, Stewart J. *Inmunología*. México DF, Editorial El Manual Moderno 1999.
184. WHO. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control, World Health Organization, 2003.
185. Wolff JW, Broom J. The genus *Leptospira* Noguchi, 1917. Problems of classification and a suggested system based on antigenic analysis. *Documenta de Medicina Geographica et Tropica* 1954;6:78-95.
186. Woods SB, Maley AD, Frerichs GN, Bailey J. Isolation of a hamster lethal strain of *Leptospira interrogans* serotype hardjo. *Vet Rec* 1983;112:437-438.
187. Yan Y, Chen. Y, Liou W, Ding J, Chen J, Zhang J, *et al*. An evaluation of the serological and epidemiological effects of the outer envelope vaccine to *Leptospira*. *J Chin Med Assoc* 2003;66:224-230.
188. You Z, Dai B, Chen Z, Yan H, Fang Z, Li S, *et al*. Immunogenicity and immunoprotection of a Leptospiral DNA vaccine. *Hua Xi Yi Da Xue Xue Bao* 1999;30:128-132.
189. Zeigler JA, Jones RH, Kubica K. Immunization against leptospirosis: Vaccine trials with heat-killed whole-cell and outer envelope antigens in hamsters. *Bulletin of the Pan American Health Organization* 1976;10:326-330.
190. Zhang Y, Quie M, Zeng X, Cheng J, Wu J, Liu J. The effect of a vaccine made from 39kd hydrophobic outer membrane protein of *Leptospira interrogans* on neurohumoral and red cell immunity function of the guinea pigs. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* 1998;29:117-121.

191. Zuerner RL, Alt DP, Palmer MV. Development of chronic and acute golden syrian hamster infection models with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. Vet Pathology 2012;49:403-411.

## **10 APÉNDICE I**

### **MEDIOS DE CULTIVO PARA *Leptospira***

## MEDIO FLETCHER

Peptona	0.3 g
Extracto de carne	0.2 g
Cloruro de Sodio (NaCl)	0.5 g
Agar	1.8 g
Agua destilada	920 ml
Suero estéril de conejo, inactivado	80 ml

Disolver cada uno de los componentes en 920 ml de agua destilada. Esterilizar el medio por autoclave y dejar enfriar.

Adicionar asépticamente del 8 -10 % de suero de conejo previamente filtrado en condiciones de esterilidad por membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  e inactivado a 56° C por 30 minutos. Distribuir el medio en volúmenes de 6 ml en tubos estériles (Myers, 1985).

## MEDIO EMJH

A) Soluciones de stock. Las soluciones se preparan disolviendo cada uno de los reactivos en 10 ml de **agua destilada estéril por autoclave**. El pH de estas soluciones no requiere ser ajustado (Myers, 1985).

1.- Glicerina 10%	1 ml / 9 ml H <sub>2</sub> O
2.- Glicerina 20%	2 ml / 8ml H <sub>2</sub> O
3.- Cianocobalamina (Vitamina B12)	0.02 g
4.- Piruvato de sodio	1g
5.- Tiamina HCl (Vitamina B1)	0.05 g
6.- Cloruro de amonio (NH <sub>4</sub> Cl)	2.5 g
7.- Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	0.15 g
8.- Cloruro de magnesio (MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	0.15 g
9.- Sulfato de manganeso (MnSO <sub>4</sub> )	0.01 g
10.- Sulfato de cobre (CuSO <sub>4</sub> )	0.03 g
1.- Sulfato de zinc (ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.04 g

B) El medio EMJH se prepara disolviendo los siguientes componentes en el orden en el que se presentan en 920 ml de **agua destilada estéril por autoclave**.

1.- Fosfato disódico, anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	1.0 g
2.- Fosfato monopotásico, anhidro ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.3 g
3.- Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ )	1.0 g
4.- Cloruro de amonio (Solución de stock)	1.0 ml
5.- Piruvato de sodio (Solución de stock)	1.0 ml
6.- Glicerina 10% (Solución de stock)	1.0 ml
7.- Tiamina HCl (Vitamina B1) (Solución de stock)	1.0 ml
8.- Fracción V de albúmina bovina en polvo	10.0 g
9.- Cloruro de calcio (Solución de stock)	0.7 ml
10.- Cloruro de magnesio (Solución de stock)	0.7ml
11.- Sulfato de zinc (Solución de stock)	1.0 ml
12.- Sulfato de magnesio (Solución de stock)	1.0 ml
13.- Glicerina 20% (Solución de stock)	1.0 ml
14.- Cianocobalamina (Solución de stock)	0.2 ml
15.- Sulfato de cobre (Solución de stock)	1.0 ml
16.- Piruvato de sodio	0.2 g
17.- Acetato de sodio	0.1 g

Dejar en agitación el medio durante una hora mientras se disuelven por separado los siguientes componentes:

C) Disolver en 40 ml por separado Tween 80 y sulfato ferroso.

Polisorvato 80 (Tween)	1.25 ml
Agua destilada estéril	40 ml

Sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.01 g
Agua destilada estéril	40 ml

Una vez disueltos perfectamente las anteriores soluciones se vierten en el medio EMJH homogenizando durante 20 min. Ajustar el pH del medio entre 7.2 a 7.4. Filtrar en forma no estéril el medio por prefiltro, membrana de 0.65  $\mu\text{m}$ , 0.45  $\mu\text{m}$  y 0.22  $\mu\text{m}$ . Finalmente, filtrar de forma estéril el medio EMJH con membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ . Distribuir en volúmenes de 6 ml y 100 ml.

## **11 APÉNDICE II**

### **SOLUCIONES PARA LA PRUEBA DE ELISA Y AGLUTINACIÓN MICROSCÓPICA**

### **SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA (SSF)**

Cloruro de sodio (Na Cl)	8.5 g
Agua destilada	1,000 ml

Disolver el Cloruro de sodio en 1000 ml de agua destilada, distribuir en botellas con tapón de rosca y esterilizar por autoclave. El pH final es de 7.4 (Myers, 1985).

### **SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (SAF)**

La solución amortiguadora de fosfatos se prepara a partir dos soluciones de Stock.

A) Solución amortiguadora de Sorensen (el pH final de la solución Sorensen es de 7.6).

Fosfato disódico Anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	8.33 g
Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1.09 g
Agua destilada	1,000 ml

B) Solución salina fisiológica (SSF)

La solución amortiguada de fosfatos (SAF) se prepara mezclando 40 ml de la solución A (Sorensen) con 460 ml de la solución B (SSF). Distribuir la SAF en botellas con tapón de rosca y esterilizar por autoclave. El pH final debe ser 7.2 (Myers, 1985).

### **SOLUCIÓN DE LAVADO PARA LA PRUEBA DE ELISA**

La solución de lavado se prepara con solución amortiguada de fosfatos (SAF) y Tween 20 al 0.05% v/v.

Solución amortiguada de fosfatos	1,000 ml
Tween 20	0.500 ml

### **SOLUCIÓN DE BLOQUEO PARA LA PRUEBA DE ELISA**

La solución de bloqueo se prepara con solución amortiguada de fosfatos (SAF) con 3% de leche descremada (p/v).

Solución amortiguada de fosfatos	1,000 ml
Leche descremada	30 g

### **SOLUCIÓN DE INCUBACIÓN PARA LA PRUEBA DE ELISA**

La solución de incubación (para diluir el suero problema y el conjugado), se prepara con SAF adicionando Tween 20 al 0.05% v/v y leche descremada al 3% p/v.

Solución amortiguada de fosfatos	1,000 ml
Tween 20	0.500 ml
Leche descremada	30 g

## SOLUCIÓN DE PARO PARA LA PRUEBA DE ELISA

La solución de paro se prepara con ácido clorhídrico al 2 N.

Agua destilada	927 ml
Ácido Clorhídrico (HCl)	73 ml

## **12 APÉNDICE III**

### **DATOS CRUDOS DE LA DOSIS LETAL 50% (DL50)**

**CUADRO A:** Datos generales del Grupo 1 DL50 hámsteres inoculados con 100 microorganismos (identificación del animal, fecha de desafío, fecha de muerte y tipo de muerte) y resultados de las pruebas diagnósticas del estudio bacteriológico (microscopia de campo oscuro y cultivo bacteriológico), estudio molecular (PCR) y estudio serológico (Aglutinación Microscópica). En estas pruebas los resultados se clasifican como 0 = Negativo, 1 = Positivo. Para la prueba de aglutinación microscópica se anota el título de la última dilución positiva. MS = Animal muerto con signos de enfermedad durante el desafío, E = Animal muerto por eutanasia sin signos al final del experimento. S/M = Sin muestra, N/R = No realizado, CONT = Contaminado.

100 MICROORGANISMOS	IDENTIFICACIÓN DEL HÁMSTER	FECHA DE INOCULACIÓN	FECHA DE MUERTE	TIPO DE MUERTE	MICROSCÓPIA CAMPO OSCURO				CULTIVO BACTERIOLÓGICO				PCR		AGLUTINACIÓN MICROSCÓPICA
					ORINA	RIÑÓN	HÍGADO	SANGRE	ORINA	RIÑÓN	HÍGADO	SANGRE	RIÑÓN	HÍGADO	
DOSIS LETAL 50%	H1	060310	150310	MS	S/M	1	1	S/M	S/M	1	1	S/M	1	1	S/M
	H2	060310	150310	MS	S/M	1	1	S/M	S/M	1	1	S/M	1	1	S/M
	H3	060310	150310	MS	S/M	1	1	S/M	S/M	1	1	S/M	1	1	S/M
	H4	060310	160310	MS	S/M	1	1	S/M	S/M	1	1	S/M	1	1	S/M
	H5	060310	160310	MS	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1/320
	H6	060310	160310	MS	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	H7	060310	240310	E	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1/2560
	H8	060310	240310	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**CUADRO B:** Datos generales del Grupo 2 DL50 hámsteres inoculados con 10 microorganismos (identificación del animal, fecha de desafío, fecha de muerte y tipo de muerte) y resultados de las pruebas diagnósticas del estudio bacteriológico (microscopia de campo oscuro y cultivo bacteriológico), estudio molecular (PCR) y estudio serológico (Aglutinación Macroscópica). En estas pruebas los resultados se clasifican como 0 = Negativo, 1 = Positivo. Para la prueba de aglutinación microscópica se anota el título de la última dilución positiva. MS = Animal muerto con signos de enfermedad durante el desafío, E = Animal muerto por eutanasia sin signos al final del experimento. S/M = Sin muestra, N/R = No realizado, CONT = Contaminado.

10 MICROORGANISMOS	IDENTIFICACIÓN DEL HÁMSTER	FECHA DE INOCULACIÓN	FECHA DE MUERTE	TIPO DE MUERTE	MICROSCÓPIA CAMPO OSCURO				CULTIVO BACTERIOLÓGICO				PCR		AGLUTINACIÓN MICROSCÓPIA	
					ORINA	RIÑÓN	HÍGADO	SANGRE	ORINA	RIÑÓN	HÍGADO	SANGRE	RIÑÓN	HÍGADO		
DOSIS LETAL 50%	H1	060310	160310	MS	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	H2	060310	160310	MS	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1/20
	H3	060310	160310	MS	S/M	1	1	1	S/M	1	1	1	1	1	1	1/20
	H4	060310	170310	MS	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
	H5	060310	170310	MS	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	S/M
	H6	060310	170310	MS	0	1	1	1	S/M	1	CONT	1	0	0	0	0
	H7	060310	180310	MS	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1/40
	H8	060310	240310	E	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1/2560

**CUADRO C:** Datos generales del Grupo 3 DL50 hámsteres inoculados con 5 microorganismos (identificación del animal, fecha de desafío, fecha de muerte y tipo de muerte) y resultados de las pruebas diagnósticas del estudio bacteriológico (microscopia de campo oscuro y cultivo bacteriológico), estudio molecular (PCR) y estudio serológico (Aglutinación Microscópica). En estas pruebas los resultados se clasifican como 0 = Negativo, 1 = Positivo. Para la prueba de aglutinación microscópica se anota el título de la última dilución positiva. MS = Animal muerto con signos de enfermedad durante el desafío, E = Animal muerto por eutanasia sin signos al final del experimento. S/M = Sin muestra, N/R = No realizado, CONT = Contaminado.

5 MICROORGANISMOS	IDENTIFICACIÓN DEL HÁMSTER	FECHA DE INOCULACIÓN	FECHA DE MUERTE	TIPO DE MUERTE	MICROSCÓPIA CAMPO OSCURO				CULTIVO BACTERIOLÓGICO				PCR		AGLUTINACIÓN MICROSCÓPIA	
					ORINA	RIÑÓN	HÍGADO	SANGRE	ORINA	RIÑÓN	HÍGADO	SANGRE	RIÑÓN	HÍGADO		
DOSIS LETAL 50%	H1	060310	160310	MS	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	H2	060310	160310	MS	1	1	1	1	S/M	1	1	1	1	1	1	0
	H3	060310	170310	MS	S/M	1	1	1	S/M	1	1	1	1	1	1	1/320
	H4	060310	170310	MS	S/M	1	1	0	S/M	1	1	1	1	0	0	S/M
	H5	060310	170310	MS	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1/20
	H6	060310	240310	E	S/M	1	0	0	S/M	1	1	1	0	0	0	0
	H7	060310	240310	E	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
	H8	060310	240310	E	S/M	1	1	1	S/M	1	1	1	1	1	1	1/20

**CUADRO D:** Datos generales del Grupo 4 DL50 hámsteres inoculados con 1 microorganismo (identificación del animal, fecha de desafío, fecha muerte y tipo de muerte) y resultados de las pruebas diagnósticas del estudio bacteriológico (microscopia de campo oscuro y cultivo bacteriológico), estudio molecular (PCR) y estudio serológico (Aglutinación Microscópica). En estas pruebas los resultados se clasifican como 0 = Negativo, 1 = Positivo. Para la prueba de aglutinación microscópica se anota el título de la última dilución positiva. MS = Animal muerto con signos de enfermedad durante el desafío, E = Animal muerto por eutanasia sin signos al final del experimento. S/M = Sin muestra, N/R = No realizado, CONT = Contaminado.

DOSIS LETAL 50% 1 MICROORGANISMO	IDENTIFICACIÓN DEL HÁMSTER	FECHA DE INOCULACIÓN	FECHA DE MUERTE	TIPO DE MUERTE	MICROSCÓPIA CAMPO OSCURO				CULTIVO BACTERIOLÓGICO				PCR		AGLUTINACIÓN MICROSCÓPIA
					ORINA	RIÑÓN	HÍGADO	SANGRE	ORINA	RIÑÓN	HÍGADO	SANGRE	RIÑÓN	HÍGADO	
	H1	060310	160310	MS	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
	H2	060310	170310	MS	S/M	1	1	1	S/M	1	1	1	1	1	1/20
	H3	060310	170310	MS	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1/40
	H4	060310	170310	MS	S/M	0	0	0	S/M	1	1	1	1	1	1/40
	H5	060310	240310	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	H6	060310	240310	E	S/M	0	0	0	S/M	0	0	0	0	0	1/20
	H7	060310	240310	E	S/M	0	0	0	S/M	0	0	0	0	0	0
	H8	060310	240310	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/40

## **13 APÉNDICE IV**

**DATOS CRUDOS DE LA PRUEBA DE POTENCIA PARA LAS  
BACTERINAS CON CUENTAS DE  $2.4 \times 10^8$  LEPTOSPIRAS/ml**

**CUADRO A:** Datos generales del Grupo 1 Bacterina CHU-VI (Canicola cepa Hond Utrecht IV referencia) (identificación del animal, fecha de desafío, días de muerte postdesafío y forma de muerte) y resultados de las pruebas diagnósticas del estudio bacteriológico (microscopia de campo oscuro y cultivo bacteriológico), estudio molecular (PCR) y estudio serológico (Aglutinación Microscópica y prueba de ELISA de las 4 muestras). En estas pruebas los resultados se clasifican como 0 = Negativo, 1 = Positivo. Para la prueba de aglutinación microscópica se anota el título de la última dilución positiva. Para la prueba de ELISA se muestra el resultado final y la lectura de la densidad óptica (DO) obtenida a 490<sub>nm</sub>. Punto de corte IgM = DO<sub>490nm</sub> 0.253. Punto de corte IgG = DO<sub>490nm</sub> 0.218. MS = Animal muerto con signos de enfermedad durante el desafío, E = Animal muerto por eutanasia sin signos al final del experimento. S/M = Sin muestra, N/R = No realizado, CONT = Contaminado.

IDENTIFICACIÓN DEL HÁMSTER	FECHA DE DESAFÍO	SERovariedad Canicola CEPA LOCaS46 (200 DL 50%)	DÍAS DE MUERTE POSTDESAFÍO	FORMA DE MUERTE (RIPE/UT)	MICROSCÓPIA CAMPO OSCURO				CULTIVO BACTERIO-LÓGICO		PCR		AGLUTINACIÓN MICROSCÓPIA				ELISA															
					ORINA	RIÑÓN	HÍGADO	SANGRE	RIÑÓN	HÍGADO	RIÑÓN	HÍGADO	1RA MUESTRA	2DA MUESTRA	3RA MUESTRA	4TA MUESTRA (POSTDESAFÍO)	1RA MUESTRA		2DA MUESTRA		3RA MUESTRA		4TA MUESTRA		LECTURA DO 490 nm							
																	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
					1RA MUESTRA	2DA MUESTRA	3RA MUESTRA	4TA MUESTRA	1RA MUESTRA	2DA MUESTRA	3RA MUESTRA	4TA MUESTRA																				
H1	011110	31	E	S/M	1	0	S/M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0.185	0.132	0.111	0.086	0.268	0.17	0.392	0.141		
H2	011110	31	E	S/M	1	1	S/M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.153	0.13	0.114	0.096	0.207	0.118	0.466	0.686		
H3	011110	31	E	S/M	1	0	S/M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0.171	0.188	0.163	0.279	0.2	0.272	0.506	0.608		
H4	011110	8	MS	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.161	0.147	0.167	0.094	0.156	0.136	0.277	0.186		
H5	011110	8	MS	S/M	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.131	0.131	0.087	0.101	0.22	0.14	0.154	0.206		
H6	011110	7	MS	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.132	0.151	0.112	0.112	0.211	0.16	0.088	0.115		
H7	011110	7	MS	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.143	0.13	0.201	0.146	0.149	0.15	0.099	0.15		
H8	011110	7	MS	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.147	0.124	0.119	0.107	0.229	0.088	0.094	0.183		
H9	011110	8	MS	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.201	0.189	0.18	0.214	0.181	0.106	0.262	0.111			
H10	011110	31	E	S/M	0	0	S/M	0	0	0	0	0	1:20	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0.142	0.147	0.172	0.306	0.183	0.306	0.546	0.698		

**CUADRO B:** Datos generales del Grupo 2 Bacterina CL46-I (Canicola cepa LOCaS46 no virulenta alto pasaje) (identificación del animal, fecha de desafío, días de muerte postdesafío y forma de muerte) y resultados de las pruebas diagnósticas del estudio bacteriológico (microscopia de campo oscuro y cultivo bacteriológico), estudio molecular (PCR) y estudio serológico (Aglutinación Microscópica y prueba de ELISA de las 4 muestras). En estas pruebas los resultados se clasifican como 0 = Negativo, 1 = Positivo. Para la prueba de aglutinación microscópica se anota el título de la última dilución positiva. Para la prueba de ELISA se muestra el resultado final y la lectura de la densidad óptica (DO) obtenida a 490<sub>nm</sub>. Punto de corte IgM = DO<sub>490nm</sub> 0.253. Punto de corte IgG = DO<sub>490nm</sub> 0.218. MS = Animal muerto con signos de enfermedad durante el desafío, E = Animal muerto por eutanasia sin signos al final del experimento. S/M = Sin muestra, N/R = No realizado, CONT = Contaminado.

IDENTIFICACIÓN DEL HAMSTER	FECHA DE DESAFÍO SEROVARIEDAD Canicola CEPA LOCaS46 (200 DL 50%)	DÍAS DE MUERTE POSTDESAFÍO	FORMA DE MUERTE (RIP/EUT)	MICROSCÓPIA CAMPO OSCURO				CULTIVO BACTERIO- LÓGICO		PCR		AGLUTINACIÓN MICROSCÓPIA				ELISA															
				ORINA	RIÑÓN	HÍGADO	SANGRE	RIÑÓN	HÍGADO	RIÑÓN	HÍGADO	1RA MUESTRA	2DA MUESTRA	3RA MUESTRA	4TA MUESTRA (POSTDESAFÍO)	1RA MUESTRA		2DA MUESTRA		3RA MUESTRA		4TA MUESTRA		LECTURA DO 490 nm							
																IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
				1RA MUESTRA	2DA MUESTRA	3RA MUESTRA	4TA MUESTRA	1RA MUESTRA	2DA MUESTRA	3RA MUESTRA	4TA MUESTRA																				
H1	011110	31	E	S/M	1	0	S/M	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0.127	0.142	0.178	0.109	0.19	0.219	0.838	1.789		
H2	011110	8	MS	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.137	0.087	0.218	0.081	0.221	0.096	0.149	0.198		
H3	011110	31	E	S/M	0	0	S/M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0.133	0.081	0.177	0.106	0.175	0.256	0.605	1.283			
H4	011110	8	MS	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.138	0.084	0.123	0.095	0.178	0.084	0.202	0.198		
H5	011110	31	E	0	1	0	S/M	0	0	0	0	1:20	0	0	1:20	1	0	0	1	0	0	1	0	0.269	0.179	0.2	0.319	0.151	0.132	0.335	0.159
H6	011110	7	MS	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.144	0.083	0.24	0.103	0.145	0.109	0.159	0.138		
H7	011110	1	MS	S/M	S/M	S/M	S/M	S/M	S/M	S/M	S/M	S/M	1:20	0	S/M	S/M	S/M	0	1	0	0	S/M	S/M	S/M	S/M	0.21	0.22	0.143	0.159	S/M	S/M
H8	011110	31	E	S/M	1	0	S/M	0	0	0	0	0	0	0	1:1280	0	0	0	0	0	1	1	1	0.138	0.086	0.213	0.106	0.111	0.221	0.637	1.498
H9	011110	31	E	S/M	0	0	S/M	0	0	0	0	0	0	0	1:40	0	0	0	0	0	1	1	1	0.131	0.09	0.2	0.1	0.09	0.238	0.342	0.232
H10	011110	10	MS	S/M	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	S/M	0	0	1	0	0	0	S/M	S/M	0.139	0.075	0.256	0.111	0.162	0.085	S/M	S/M

**CUADRO C:** Datos generales del Grupo 3 Bacterina CL46-V (Canicola cepa LOCaS46 virulenta bajo pasaje) (identificación del animal, fecha de desafío, días de muerte postdesafío y forma de muerte) y resultados de las pruebas diagnósticas del estudio bacteriológico (microscopía de campo oscuro y cultivo bacteriológico), estudio molecular (PCR) y estudio serológico (Aglutinación Microscópica y prueba de ELISA de las 4 muestras). En estas pruebas los resultados se clasifican como 0 = Negativo, 1 = Positivo. Para la prueba de aglutinación microscópica se anota el título de la última dilución positiva. Para la prueba de ELISA se muestra el resultado final y la lectura de la densidad óptica (DO) obtenida a 490<sub>nm</sub>. Punto de corte IgM = DO<sub>490nm</sub> 0.253. Punto de corte IgG = DO<sub>490nm</sub> 0.218. MS = Animal muerto con signos de enfermedad durante el desafío, E = Animal muerto por eutanasia sin signos al final del experimento. S/M = Sin muestra, N/R = No realizado, CONT = Contaminado.

IDENTIFICACIÓN DEL HÁMSTER	FECHA DE DESAFÍO	SEROVARIEDAD Canicola CEPA LOCaS46 (200 DL 50%)	DÍAS DE MUERTE POSTDESAFÍO	FORMA DE MUERTE (RIP/EUT)	MICROSCÓPIA CAMPO OSCURO				CULTIVO BACTERIOLÓGICO		PCR		AGLUTINACIÓN MICROSCÓPIA				ELISA																									
					ORINA	RIÑÓN	HÍGADO	SANGRE	RIÑÓN	HÍGADO	RIÑÓN	HÍGADO	1RA MUESTRA	2DA MUESTRA	3RA MUESTRA	4TA MUESTRA (POSTDESAFÍO)	1RA MUESTRA		2DA MUESTRA		3RA MUESTRA		4TA MUESTRA		LECTURA DO 490 nm																	
																	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG				
					1RA MUESTRA	2DA MUESTRA	3RA MUESTRA	4TA MUESTRA	1RA MUESTRA	2DA MUESTRA	3RA MUESTRA	4TA MUESTRA																														
H1	011110		8	MS	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.136	0.089	0.239	0.111	0.107	0.099	0.171	0.145
H2	011110		8	MS	S/M	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1:80	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.174	0.015	0.167	0.179	0.164	0.143	0.277	0.185
H3	011110		9	MS	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1:40	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.123	0.084	0.278	0.194	0.162	0.139	0.246	0.241	
H4	011110		31	E	S/M	0	0	S/M	0	0	0	0	0	0	0	1:2560	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.116	0.09	0.32	0.33	0.193	0.139	0.535	0.801	
H5	011110		31	E	S/M	0	0	S/M	1	0	0	0	0	0	0	1:2560	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.123	0.082	0.219	0.283	0.203	0.11	0.755	1.698	
H6	011110		7	MS	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1:20	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.126	0.078	0.104	0.088	0.27	0.103	0.357	0.292	
H7	011110		8	MS	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.13	0.082	0.115	0.103	0.106	0.09	0.129	0.179	
H8	011110		8	MS	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0.132	0.181	0.088	0.139	0.09	0.121	0.132	
H9	011110		9	MS	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.131	0.085	0.199	0.101	0.185	0.153	0.125	0.16	
H10	011110		31	E	S/M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:20	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.133	0.108	0.276	0.157	0.164	0.173	0.318	0.156	



**CUADRO E:** Datos generales del Grupo 5 Testigo Aduvante Hidróxido de aluminio (identificación del animal, fecha de desafío, días de muerte postdesafío y forma de muerte) y resultados de las pruebas diagnósticas del estudio bacteriológico (microscopia de campo oscuro y cultivo bacteriológico), estudio molecular (PCR) y estudio serológico (Aglutinación Microscópica y prueba de ELISA de las 4 muestras). En estas pruebas los resultados se clasifican como 0 = Negativo, 1 = Positivo. Para la prueba de aglutinación microscópica se anota el título de la última dilución positiva. Para la prueba de ELISA se muestra el resultado final y la lectura de la densidad óptica (DO) obtenida a 490<sub>nm</sub>. Punto de corte IgM = DO<sub>490nm</sub> 0.253. Punto de corte IgG = DO<sub>490nm</sub> 0.218. MS = Animal muerto con signos de enfermedad durante el desafío, E = Animal muerto por eutanasia sin signos al final del experimento. S/M = Sin muestra, N/R = No realizado, CONT = Contaminado.

IDENTIFICACIÓN DEL HAMSTER	FECHA DE DESAFÍO SEROVARIEDAD Camicola CEPA LOCaS46 (200 DL 50%)	DÍAS DE MUERTE POSTDESAFÍO	FORMA DE MUERTE (RIP/EUT)	MICROSCÓPIA CAMPO OSCURO				CULTIVO BACTERIO- LÓGICO		PCR		AGLUTINACIÓN MICROSCÓPIA				ELISA																																						
				ORINA	RIÑÓN	HÍGADO	SANGRE	RIÑÓN	HÍGADO	RIÑÓN	HÍGADO	1RA MUESTRA	2DA MUESTRA	3RA MUESTRA	4TA MUESTRA (POSTDESAFÍO)	1RA MUESTRA		2DA MUESTRA		3RA MUESTRA		4TA MUESTRA		LECTURA DO 490 nm																														
																IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG															
				1RA MUESTRA		2DA MUESTRA		3RA MUESTRA		4TA MUESTRA																																												
H1	011110	8	MS	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.152	0.139	0.114	0.087	0.199	0.101	0.084	0.129													
H2	011110	8	MS	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1:40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.144	0.111	0.14	0.143	0.226	0.152	0.26	0.122										
H3	011110	7	MS	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.202	0.117	0.171	0.256	0.219	0.163	0.177	0.116								
H4	011110	8	MS	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.238	0.112	0.102	0.102	0.239	0.159	0.152	0.152						
H5	011110	8	MS	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.185	0.096	0.184	0.089	0.176	0.211	0.144	0.334				
H6	011110	8	MS	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1:20	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.225	0.121	0.132	0.223	0.089	0.102	0.08	0.092			
H7	011110	8	MS	S/M	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.144	0.211	0.191	0.101	0.16	0.104	0.195	0.1		
H8	011110	7	MS	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.183	0.125	0.149	0.141	0.141	0.098	0.088	0.103	
H9	011110	8	MS	1	1	1	S/M	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.201	0.118	0.163	0.215	0.133	0.097	0.15	0.095	
H10	011110	8	MS	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1:20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.258	0.165	0.176	0.235	0.137	0.109	0.131	0.159

**CUADRO F:** Datos generales del Grupo 6 Testigo SSF (identificación del animal, fecha de desafío, días de muerte postdesafío y forma de muerte) y resultados de las pruebas diagnósticas del estudio bacteriológico (microscopia de campo oscuro y cultivo bacteriológico), estudio molecular (PCR) y estudio serológico (Aglutinación Microscópica y prueba de ELISA de las 4 muestras). En estas pruebas los resultados se clasifican como 0 = Negativo, 1 = Positivo. Para la prueba de aglutinación microscópica se anota el título de la última dilución positiva. Para la prueba de ELISA se muestra el resultado final y la lectura de la densidad óptica (DO) obtenida a 490<sub>nm</sub>. Punto de corte IgM = DO<sub>490nm</sub> 0.253. Punto de corte IgG = DO<sub>490nm</sub> 0.218. MS = Animal muerto con signos de enfermedad durante el desafío, E = Animal muerto por eutanasia sin signos al final del experimento. S/M = Sin muestra, N/R = No realizado, CONT = Contaminado.

IDENTIFICACIÓN DEL HÁMSTER	FECHA DE DESAFÍO	SEROVARIEDAD Canicola CEPA LOCaS46 (200 DL 50%)	DÍAS DE MUERTE POSTDESAFÍO	FORMA DE MUERTE (RIPE/UT)	MICROSCÓPIA CAMPO OSCURO				CULTIVO BACTERIOLÓGICO		PCR		AGLUTINACIÓN MICROSCÓPIA				ELISA																							
					ORINA	RIÑÓN	HÍGADO	SANGRE	RIÑÓN	HÍGADO	RIÑÓN	HÍGADO	1RA MUESTRA	2DA MUESTRA	3RA MUESTRA	4TA MUESTRA (POSTDESAFÍO)	1RA MUESTRA		2DA MUESTRA		3RA MUESTRA		4TA MUESTRA		LECTURA DO 490 nm															
																	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG		
					1RA MUESTRA	2DA MUESTRA	3RA MUESTRA	4TA MUESTRA	1RA MUESTRA	2DA MUESTRA	3RA MUESTRA	4TA MUESTRA																												
H1	011110		8	MS	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.089	0.083	0.215	0.082	0.134	0.155	0.125	0.19
H2	011110		8	MS	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.139	0.095	0.105	0.087	0.089	0.089	0.175	0.108	
H3	011110		8	MS	S/M	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.216	0.088	0.126	0.087	0.159	0.087	0.126	0.134	
H4	011110		8	MS	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1:40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.176	0.099	0.19	0.144	0.094	0.084	0.288	0.118	
H5	011110		8	MS	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.226	0.139	0.173	0.184	0.15	0.081	0.213	0.099	
H6	011110		8	MS	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.173	0.091	0.184	0.086	0.146	0.154	0.125	0.145	
H7	011110		8	MS	1	1	1	0	1	1	1	1:20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.27	0.079	0.172	0.09	0.153	0.173	0.124	0.192	
H8	011110		8	MS	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.247	0.082	0.104	0.087	0.091	0.086	0.186	0.117	
H9	011110		8	MS	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1:20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.092	0.096	0.201	0.086	0.134	0.093	0.255	0.093	
H10	011110		9	MS	1	1	1	S/M	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.239	0.079	0.142	0.131	0.092	0.08	0.187	0.096	

## **14 APÉNDICE V**

**DATOS CRUDOS DE LA PRUEBA DE POTENCIA PARA LAS  
BACTERINAS CON CUENTAS DE  $2.4 \times 10^9$  LEPTOSPIRAS/ml**

**CUADRO A:** Datos generales del Grupo 7 Bacterina CHU-IV (Canicola cepa Hond Utrecht IV referencia) (identificación del animal, fecha de desafío, días de muerte postdesafío y forma de muerte) y resultados de las pruebas diagnósticas del estudio bacteriológico (microscopia de campo oscuro y cultivo bacteriológico), estudio molecular (PCR) y estudio serológico (Aglutinación Microscópica y prueba de ELISA de las 4 muestras). En estas pruebas los resultados se clasifican como 0 = Negativo, 1 = Positivo. Para la prueba de aglutinación microscópica se anota el título de la última dilución positiva. Para la prueba de ELISA se muestra el resultado final y la lectura de la densidad óptica (DO) obtenida a 490<sub>nm</sub>. Punto de corte IgM = DO<sub>490nm</sub> 0.253. Punto de corte IgG = DO<sub>490nm</sub> 0.218. MS = Animal muerto con signos de enfermedad durante el desafío, E = Animal muerto por eutanasia sin signos al final del experimento. S/M = Sin muestra, N/R = No realizado, CONT = Contaminado.

IDENTIFICACIÓN DEL HÁMSTER	FECHA DE DESAFÍO SEROVARIEDAD Canicola CEPa LOC.a846 (200 DL 50%)	DÍAS DE MUERTE POSTDESAFÍO	FORMA DE MUERTE (RIP/EUT)	MICROSCÓPIA CAMPO OSCURO				CULTIVO BACTERIO-LÓGICO		PCR		AGLUTINACIÓN MICROSCÓPIA				ELISA															
				ORINA	RIÑÓN	HÍGADO	SANGRE	RIÑÓN	HÍGADO	RIÑÓN	HÍGADO	1RA MUESTRA	2DA MUESTRA	3RA MUESTRA	4TA MUESTRA (POSTDESAFÍO)	1RA MUESTRA		2DA MUESTRA		3RA MUESTRA		4TA MUESTRA		LECTURA DO 490 nm							
																IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
				1RA MUESTRA		2DA MUESTRA		3RA MUESTRA		4TA MUESTRA																					
H1	171210	8	MS	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	S/M	0	0	0	0	0	0	S/M	S/M	0.101	0.129	0.135	0.074	0.195	0.132	S/M	S/M
H2	171210	28	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.115	0.116	0.157	0.094	0.148	0.199	0.262	0.178	
H3	171210	28	E	S/M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.089	0.107	0.119	0.112	0.099	0.078	0.307	0.083		
H4	171210	28	E	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1:40	1:160	1:320	0	0	1	0	0	1	1	1	0.117	0.15	0.261	0.147	0.142	0.233	0.458	0.426
H5	171210	28	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.114	0.086	0.153	0.088	0.115	0.121	0.407	0.449		
H6	171210	28	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:640	1:1280	0	0	0	0	0	1	1	1	0.164	0.066	0.147	0.09	0.212	0.24	0.405	0.63
H7	171210	28	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:20	0	0	0	0	0	1	1	0.118	0.088	0.131	0.081	0.142	0.133	0.442	0.509	
H8	171210	28	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0.122	0.092	0.139	0.104	0.162	0.582	0.446	0.164		
H9	171210	28	E	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0.117	0.159	0.149	0.12	0.127	0.087	0.345	0.115		
H10	171210	28	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0.118	0.123	0.162	0.2	0.121	0.241	0.322	0.202		

**CUADRO B:** Datos generales del Grupo 8 Bacterina CL46-I (Canicola cepa LOCaS46 no virulenta alto pasaje) (identificación del animal, fecha de desafío, días de muerte postdesafío y forma de muerte) y resultados de las pruebas diagnósticas del estudio bacteriológico (microscopia de campo oscuro y cultivo bacteriológico), estudio molecular (PCR) y estudio serológico (Aglutinación Microscópica y prueba de ELISA de las 4 muestras). En estas pruebas los resultados se clasifican como 0 = Negativo, 1 = Positivo. Para la prueba de aglutinación microscópica se anota el título de la última dilución positiva. Para la prueba de ELISA se muestra el resultado final y la lectura de la densidad óptica (DO) obtenida a 490<sub>nm</sub>. Punto de corte IgM = DO<sub>490nm</sub> 0.253. Punto de corte IgG = DO<sub>490nm</sub> 0.218. MS = Animal muerto con signos de enfermedad durante el desafío, E = Animal muerto por eutanasia sin signos al final del experimento. S/M = Sin muestra, N/R = No realizado, CONT = Contaminado.

IDENTIFICACIÓN DEL HÁMSTER	FECHA DE DESAFÍO SEROVARIEDAD Canicola CEPA LOCaS46 (200 DL 50%)	DÍAS DE MUERTE POSTDESAFÍO	FORMA DE MUERTE (RIP/EUT)	MICROSCÓPIA CAMPO OSCURO				CULTIVO BACTERIOLÓGICO		PCR		AGLUTINACIÓN MICROSCÓPICA				ELISA																
				ORINA	RÍÑÓN	HÍGADO	SANGRE	RÍÑÓN	HÍGADO	RÍÑÓN	HÍGADO	1RA MUESTRA	2DA MUESTRA	3RA MUESTRA	4TA MUESTRA (POSTDESAFÍO)	1RA MUESTRA		2DA MUESTRA		3RA MUESTRA		4TA MUESTRA		LECTURA DO 490 nm								
																IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
				1RA MUESTRA	2DA MUESTRA	3RA MUESTRA	4TA MUESTRA	1RA MUESTRA	2DA MUESTRA	3RA MUESTRA	4TA MUESTRA																					
H1	171210	28	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:80	1:40	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0.123	0.081	0.134	0.105	0.163	0.228	0.47	0.449
H2	171210	28	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.121	0.084	0.131	0.131	0.119	0.162	0.347	0.287	
H3	171210	28	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:160	1:320	1:40	0	0	1	0	0	1	1	1	0.123	0.089	0.27	0.147	0.229	0.771	0.506	0.524	
H4	171210	28	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:80	1:20	0	0	0	0	0	1	1	1	0.112	0.081	0.118	0.095	0.141	0.26	0.544	0.626		
H5	171210	28	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:20	0	0	0	0	0	0	1	1	0.125	0.157	0.15	0.153	0.146	0.181	0.429	0.338		
H6	171210	28	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:40	1:20	1:20	0	0	1	0	0	1	1	1	0.139	0.155	0.261	0.117	0.135	0.236	0.557	0.361	
H7	171210	28	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0.146	0.072	0.131	0.098	0.17	0.309	0.411	0.325		
H8	171210	28	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:80	1:40	0	0	0	0	0	1	1	1	0.149	0.084	0.137	0.171	0.15	0.221	0.513	0.435		
H9	171210	28	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:20	1:20	0	0	0	0	0	1	1	1	0.12	0.08	0.149	0.118	0.159	0.335	0.427	0.365		
H10	171210	28	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.123	0.085	0.106	0.084	0.095	0.087	0.442	0.384		



**CUADRO D:** Datos generales del Grupo 10 Testigo SSF (identificación del animal, fecha de desafío, días de muerte postdesafío y forma de muerte) y resultados de las pruebas diagnósticas del estudio bacteriológico (microscopia de campo oscuro y cultivo bacteriológico), estudio molecular (PCR) y estudio serológico (Aglutinación Microscópica y prueba de ELISA de las 4 muestras). En estas pruebas los resultados se clasifican como 0 = Negativo, 1 = Positivo. Para la prueba de aglutinación microscópica se anota el título de la última dilución positiva. Para la prueba de ELISA se muestra el resultado final y la lectura de la densidad óptica (DO) obtenida a 490<sub>nm</sub>. Punto de corte IgM = DO<sub>490nm</sub> 0.253. Punto de corte IgG = DO<sub>490nm</sub> 0.218. MS = Animal muerto con signos de enfermedad durante el desafío, E = Animal muerto por eutanasia sin signos al final del experimento. S/M = Sin muestra, N/R = No realizado, CONT = Contaminado.

IDENTIFICACIÓN DEL HÁMSTER	FECHA DE DESAFÍO SEROVARIEDAD Canicola CEPA LOC.aS46 (200 DL 50%)	DÍAS DE MUERTE POSTDESAFÍO	FORMA DE MUERTE (RIP/EUT)	MICROSCÓPIA CAMPO OSCURO				CULTIVO BACTERIO-LÓGICO		PCR		AGLUTINACIÓN MICROSCÓPIA				ELISA															
				ORINA	RIÑÓN	HÍGADO	SANGRE	RIÑÓN	HÍGADO	RIÑÓN	HÍGADO	1RA MUESTRA	2DA MUESTRA	3RA MUESTRA	4TA MUESTRA (POSTDESAFÍO)	1RA MUESTRA		2DA MUESTRA		3RA MUESTRA		4TA MUESTRA		LECTURA DO 490 nm							
																IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
				1RA MUESTRA		2DA MUESTRA		3RA MUESTRA		4TA MUESTRA																					
H1	171210	9	MS	1	1	1	0	1	CONT	1	1	0	0	0	S/M	0	0	0	0	0	0	S/M	S/M	0.203	0.091	0.18	0.133	0.162	0.094	S/M	S/M
H2	171210	13	MS	S/M	0	0	S/M	1	1	0	0	0	0	0	S/M	0	0	0	0	0	0	S/M	S/M	0.184	0.15	0.192	0.149	0.094	0.095	S/M	S/M
H3	171210	10	MS	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	S/M	0	0	0	0	0	0	S/M	S/M	0.232	0.109	0.161	0.209	0.131	0.15	S/M	S/M
H4	171210	9	MS	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	S/M	0	0	0	0	0	0	S/M	S/M	0.178	0.092	0.112	0.137	0.087	0.086	S/M	S/M