



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

**Inmunogenicidad de una vacuna elaborada con proteínas de membranas
externas de una cepa de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola
(LOCaS46).**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS:

P R E S E N T A

JOSÉ MANUEL RAMÍREZ ORTEGA

TUTOR: Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
COMITÉ TUTORAL: Dra. Laura Cobos Marín
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Dr. Edgar Zenteno Galindo.
Facultad de Medicina

MÉXICO, D.F. DICIEMBRE 2012



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 Margarita y Mario por todo su amor, apoyo y confianza.

A mis hermanos Mario y Alejandro por los buenos recuerdos, a Miguel y Rosario su cariño, apoyo y comprensión es invaluable gracias.

A Alma Flor Islas Rueda con mucho cariño, amor y respeto, formas parte de mi vida, gracias por ayudarme a ser mejor persona en todos los sentidos, por compartir tu vida conmigo, te amo.

A mis amigos de siempre, hemos compartido sueños, proyectos, ideas, me han apoyado para seguir con estas locuras.

A mis compañeros en esta vida que no hablan pero transmiten su cariño y amor con lenguetazos, ladridos, mordidas, maullidos, arañazos y ronroneos, los que se han ido, los que continúan y los que vendrán.

A la memoria de todos los animales en los cuales realice mis experimentos, que de forma arbitraria tome sus vidas, este es un pequeño homenaje.

Manuel

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal.

Al Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ.

A la Unidad de Servicios de Diagnóstico y Constatación del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal del Altiplano.

Al Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma por darme la oportunidad de realizar mi tesis de Maestría y permitirme formar parte del grupo de investigación de *Leptospira* y Leptospirosis, por sus comentarios y amistad brindados durante este tiempo.

A la Dra Myrna A. Vicencio Mallén por su amistad, comentarios y apoyo durante mi estancia en la USEDICO.

Al Sr. Eloy García por compartir sus experiencias y conocimientos, así como por su amistad y apoyo.

A los miembros del comité tutorial por su valiosa colaboración, sus consejos y críticas para la realización de este trabajo: Dra. Laura Cobos Marín y Dr. Edgar Zenteno Galindo.

A los doctores Enrique Salas Tellez, Francisco Javier Basurto Alcántara, Victor Manuel Banda Ruíz y Alfredo Sahagun Ruíz por ser parte del jurado y enriquecer el escrito de tesis.

A mis compañeros y amigos del GrILLeP por su amistad, pláticas, discusiones, críticas y apoyo: Luz Olivia Castillo Sánchez, Carlos Alfredo Carmona Gasca, Mario Hidalgo Ruíz, Alma Flor Islas Rueda y Lilia Patricia López Huitrado

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico a través de la beca otorgada para estudios de Maestría no. 230719 y a los proyectos PAPIIT IN222806 “GspD la supuesta proteína del T2S de *Leptospira*”, PAPIIT 1N221409 “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

	Página
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 Biología de <i>Leptospira</i>	4
2.2 Epidemiología.....	6
2.3 Patogenia e Inmunidad.....	8
2.4 Vacunas contra leptospirosis.....	15
3. JUSTIFICACIÓN.....	16
4. HIPÓTESIS.....	16
5. OBJETIVO GENERAL.....	16
5.1 Objetivos específicos.....	17
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
6.1 Cepas utilizadas.....	17
6.2 Extracción de membranas externas.....	18
6.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE).....	20

6.4 Preparación de los inmunógenos.....	20
6.5 Vacunación.....	21
6.6 Colección de muestras.....	24
6.7 Evaluación de la respuesta inmune humoral.....	26
6.7.1 Aglutinación microscópica (AM).....	26
6.7.2 ELISA indirecta.....	27
6.8 Aislamiento.....	28
6.9 Reacción en cadena de la Polimerasa.....	28
6.10 Detección de <i>Leptospira</i> mediante la prueba de PCR.....	29
6.11 Inmunodetección tipo Western.....	30
7. RESULTADOS.....	31
7.1 Aglutinación microscópica.....	31
7.2 ELISA indirecta.....	34
7.3 Aislamiento y estado de portador.....	39
7.4 Inmunodetección tipo Western.....	47
8. DISCUSIÓN.....	49

9. CONCLUSIONES.....	52
10. REFERENCIAS.....	54
11. APÉNDICE I. Medios de cultivo y reactivos.....	74
12. APÉNDICE II. Datos ELISAS.....	84
13. LISTA DE CUADROS.....	86
14. LISTA DE FIGURAS.....	86
15. LISTA DE ABREVIATURAS.....	87

1. RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad de distribución mundial con una gran importancia en salud pública, que afecta a diferentes especies de mamíferos domésticos y silvestres. La prevención de esta enfermedad se basa en el uso de bacterinas, sin embargo ésta es de corta duración. En este trabajo, se prepararon tres inmunógenos a partir de extractos proteicos de membranas externas (PME) de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola: cepa LOCaS46 virulenta y su variante no virulenta y de la cepa de referencia Hond Utrecht IV. Las PME fueron obtenidas con Tritón X-114, concentradas y purificadas por centrifugación, la dosis fue de 50 µg/250 µl de solución salina fisiológica por inmunógeno. Se ocuparon 60 hámsteres sirio dorado (*Mesocricetus auratus*), distribuidos en 6 grupos de 10 animales, los primeros tres para cada inmunógeno, el cuarto para el de PME de la cepa virulenta adicionada con hidróxido de aluminio como adyuvante, el quinto tratado sólo con hidróxido de aluminio y el sexto sólo con solución salina fisiológica. Los hámsteres se inmunizaron vía subcutánea, en la región dorsal, dos veces con un intervalo de 15 días, después fueron desafiados a las dos semanas de la segunda inmunización con 1,000 DL50% (4,800 leptospirosis), por vía intraperitoneal. A todos los animales se les tomaron muestras de sangre para obtener suero para realizar pruebas de aglutinación microscópica, ELISA e inmunoelectrotransferencia. También se tomaron muestras de riñón e hígado para cultivo y PCR. Con estos datos, se determinó que la sobrevivencia de los animales alcanzó 88.8% con el inmunógeno elaborado con la cepa Hond Utrecht IV, con la cepa LOCaS46 no virulenta y virulenta adicionada con adyuvante el 77.7% y con la cepa LOCaS46 virulenta 25% de sobrevivencia. La capacidad protectora contra la infección en los sobrevivientes fue de 100% con el de PME de LOCaS46 virulenta, le siguió el adicionado con adyuvante que obtuvo un 85.7%, luego el de la cepa de referencia con un 62.5% y por último con la cepa no virulenta con un 42.8%. Esto indica que el inmunógeno con PME de la cepa LOCaS46 virulenta adicionada con hidroxido de aluminio fue el mejor, tomando en cuenta ambas condiciones de sobrevivencia y protección contra la infección en los animales que sobrevivieron al desafío.

Palabras clave: inmunógeno, dosis letal 50%, ELISA, *Leptospira interrogans*, proteínas de membrana externa.

ABSTRACT

Leptospirosis is a worldwide disease with great public health importance, affecting different species of domestic and wild mammals. The prevention of this disease relies on the use of bacterin, however, this is short lived. In this paper, three immunogens were prepared from outer membrane protein extracts (OMP) of *Leptospira interrogans* serovar canicola: LOCaS46 virulent strain and avirulent variant and the reference strain Hond Utrecht IV. The OMP was obtained with Triton X-114, concentrated and purified by centrifugation, the dose was 50 µg/250 ul of physiological saline by an immunogen. It occupied 60 Golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*), divided into 6 groups of 10 animals, the first three for each immunogen, the fourth for the OMP of the virulent strain supplemented with aluminum hydroxide as adjuvant, the fifth hydroxide treated only with aluminum and sixth only with physiological saline. Hamsters were immunized subcutaneously in the dorsal region, twice with an interval of 15 days, then were challenged at two weeks after the second immunization with 1,000 LD₅₀ 1,000 (4,800 leptospire) intraperitoneally. All animals were blood sampled for serum for microscopic agglutination, ELISA and immunoblotting. Samples were also taken for kidney and liver culture and PCR. With these data, we found that the survival of the animals reached 88.8% with the immunogen prepared with strain Hond Utrecht IV, with strain avirulent and virulent LOCaS46 adjuvant added and 77.7% LOCaS46 virulent strain of 25% survival . The protective ability against infection in survivors was 100% with virulent LOCaS46 OMP, was followed by adjuvant added that scored a 85.7%, then the reference strain with 62.5% and finally with strain avirulent with a 42.8%. This indicates that the immunogen with OMP LOCaS46 virulent strain with aluminum hydroxide added was the best, taking into account both conditions of survival and protection against infection in animals survived the challenge.

Keywords: immunogen, lethal dose 50%, ELISA, *Leptospira interrogans*, outer membrane proteins.

2. INTRODUCCIÓN.

La leptospirosis es una enfermedad producida por bacterias del género *Leptospira* (Picardeau *et al.*, 2008; Waitkins 1986), ésta es una espiroqueta patógena, que afecta a mamíferos domésticos como a silvestres. Es una zoonosis, se considera como una de las más difundidas en el mundo (Faine, 1999; OMS, 1999; Levett 2001).

Esta enfermedad se presenta principalmente en regiones de climas tropicales, subtropicales y templados, su distribución geográfica es amplia, en regiones del sureste asiático está considerada como endémica.

En humanos la leptospirosis es una enfermedad ocupacional, afecta a personas que laboran en la agricultura, en explotaciones pecuarias de bovinos y cerdos principalmente, rastros, minería y limpieza de alcantarillas y drenajes (WHO, 2003; Heath, 1994; Trueba, 2004). En algunos países, los casos que se presentan están relacionados con prácticas recreativas en las que se tiene una exposición a aguas contaminadas con el microorganismo (Céspedes, 2005).

El diagnóstico de la enfermedad se basa principalmente en la prueba de aglutinación microscópica (AM), la cual detecta anticuerpos séricos contra la bacteria. La confirmación del diagnóstico se dificulta por la difícil adaptación de la bacteria a medios de cultivo y condiciones de laboratorio (Bharadwaj, 2004). Otro método de diagnóstico es la observación en campo oscuro (CO), el cual es poco sensible y altamente inespecífico por lo cual se utiliza como complementario a otros diagnósticos utilizados (Andre-Fontaine, 2006; Smith *et al.*, 1994).

En la actualidad, se utilizan diversas pruebas inmunológicas alternativas para el diagnóstico, entre ellas ELISA, inhibición de la hemoaglutinación (IHA), aglutinación macroscópica, inmunofluorescencia (IMF), inmunohistoquímica (IHQ) y otras como inoculación en hámsteres o cuyos, histopatología con tinciones de plata como Warthin Starry o Levaditi y la detección de ADN de la bacteria a partir de muestras clínicas por la prueba de PCR (Rosseti *et al.*, 2004; Gibson da Silva *et al.*, 2005; Delgado *et al.*, 2007).

2.1 Biología de *Leptospira*

El agente etiológico de la leptospirosis es una eubacteria; phylum *Spirochaetes*; clase *Spirochaetes*, orden *Spirochaetales*; familia *Leptospiraceae*; género *Leptospira* (Levett, 2001).

El japonés Hideyo Noguchi aisló varias cepas de *Leptospira* en los años 1917 y 1918 en Japón, Bélgica y Estados Unidos y su denominación se basa en sus características y a su morfología (Noguchi, 1928).

Es importante mencionar que la base de la clasificación del género es la serovariedad (taxón básico) la cual fue formulada por Wolf y Broom en 1954, y permite clasificar la relación parásito-hospedero (Wolff y Brom, 1954). Esta identificación antigénica está basada en las diferencias en la estructura de las cadenas de carbohidratos del lipopolisacarido (LPS), presente en la membrana externa de la bacteria (Faine, 1999; Bulach *et al.*, 2002; De la Peña-Moctezuma *et al.*, 1999). En esta clasificación, existen más de 260 serovariedades patógenas agrupadas en 25 serogrupos y alrededor de 60 serovariedades saprófitas con 4 serogrupos (Levett, 2001).

La clasificación genética se basa en estudios de la secuencia del ARN ribosomal (16S) y de hibridación de ácidos nucleicos, considerando catorce especies patógenas *L. alexanderi* (genomoespecie 2), *L. alstonii* (genomoespecie 1), *L. borgpetersenii*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. kirshneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii* y *L. wolffii*; y seis especies saprofitas o apatógenas. *L. biflexa*, *L. kmetyi*, *L. meyeri*, *L. vanthielii* (genomoespecie 4), *L. wolbachii* y *L. yanagawae* (genomoespecie 5) (Galloway y Levett, 2008; Levett *et al.*, 2006).

Leptospira es un microorganismo con forma espiral (espiroqueta), que mide de 0.1-0.2 μm de diámetro por 10 a 20 μm de longitud, con ganchos en uno o ambos extremos, tiene 2 flagelos periplasmáticos fijos en los extremos, que se ubican a todo lo largo y en la parte central de la bacteria, los cuales le dan los movimientos de translación, rotación y contorción característicos del género (Faine, 1999; Levett *et al.*, 2006) (Figura 1).

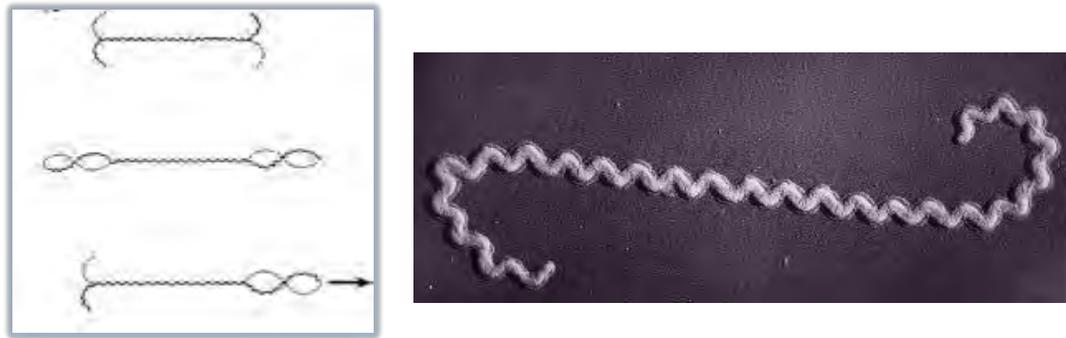


Figura 1. A. *Leptospira* con sus tres movimientos característicos. B. Morfología de la bacteria foto con microscopio electrónico de barrido (Tomado de Goldstein *et al.*, 1990).

La pared celular de *Leptospira* es similar al de otras bacterias Gram negativas, la membrana externa está conformada por proteínas, fosfolípidos y el LPS (Faine, 1999). Son microorganismos aerobios o microaerofílicos, la temperatura adecuada para su desarrollo se encuentra entre 28 y 30°C, con un pH de 7.2 a 7.6, el tiempo de replicación medio es de 12 a 24 horas. Son exigentes en cuanto a sus requerimientos nutricionales. Los ácidos grasos de cadena larga de más de 15 carbonos son la principal fuente de energía, son utilizados para la producción de lípidos celulares a través de la β -oxidación; también requieren tiamina (vitamina B1), cianocobalamina (vitamina B12), algunas cepas requieren biotina (vitamina B6), como factores de enriquecimiento, cloruro de amonio como fuente de nitrógeno y piruvato de sodio. No utilizan a los azúcares como fuente de carbono, no pueden fermentarlos, sin embargo pueden sintetizarlos por medio del ciclo del ácido tricarbóxico (Johnson y Gary, 1963; Ko *et al.*, 2009; Johnson y Gay, 1963; Stalheim y Wilson, 1964). Son oxidasa y catalasa positivas, la mayoría de ellas tiene actividad lipolítica y sólo algunas producen ureasa. Debido a su difícil desarrollo *in vitro* y a su metabolismo, las pruebas bioquímicas no son utilizadas para su identificación (Faine, 1999).

Para su desarrollo *in vitro* existen en general dos tipos de medio de cultivo de acuerdo a su composición, los que utilizan suero de conejo al 8 o 10 % como el medio Stuart, Fletcher, Korthof y Cox (Myers, 1987); y los que ocupan la fracción V de albumina sérica bovina al 1 % en este grupo se encuentra el medio EMJH (Ellingausen y

McCulloch modificado por Johnson y Harris) (Myers, 1987), uno de los más utilizados para el aislamiento y cultivo de leptospiras por su mayor contenido nutricional y formulación estandarizada, estos medios pueden ser líquidos o semisólidos (0.75% de agar) (Myers, 1987; Shenberg, 1966; Davis y Dubos, 1947). El desarrollo de leptospiras se da en aproximadamente una semana, cuando se trata de cultivos ya adaptados a las condiciones de laboratorio, en el caso de cultivos primarios a partir de muestras clínicas (sangre, orina, macerado de tejidos renales o hepáticos), el desarrollo puede tardar desde unas semanas hasta 4 meses o más de incubación (Levett, 2001). El desarrollo en medios líquidos es detectado por una ligera turbidez, en tanto que en medios semisólidos se ve la formación de anillos densos de desarrollo denominados zona o anillo de Dinger (Myers, 1987).

2.2 Epidemiología

La leptospirosis es una enfermedad que afecta a los animales domésticos (perros, cerdos y vacas principalmente) y algunos de vida libre, el humano la adquiere de manera accidental, se presenta en diferentes regiones, en zonas rurales, el contacto estrecho con diferentes especies de mamíferos domésticos infectados con animales susceptibles es la principal fuente de infección, en el caso de las zonas urbanas, los perros y particularmente los roedores (*Rattus norvegicus* y *Mus musculus*), son los principales reservorios de la enfermedad, en ambos casos las condiciones de encharcamientos, servicios sanitarios deficientes o nulos y contacto estrecho con los animales, son los factores de riesgo más relevantes para el establecimiento de la enfermedad. *Leptospira* puede entrar al hospedero a través de la piel con heridas o reblandecida por exceso de humedad, o bien las mucosas (oral, nasal o conjuntival) de hospederos accidentales como el humano, o de animales susceptibles que entran en contacto con orina, fetos abortados, secreciones uterinas de animales infectados o bien agua, lodos o aerosoles recientemente contaminados; el microorganismo ingresa al torrente sanguíneo, empezando así el proceso de infección (Adler y De la Peña-Moctezuma, 2010; Tangkanakul *et al.*, 2000; Vinetz, 2001; Ko *et al.*, 1999).

En humanos existen dos formas clínicas de la enfermedad: benigna que puede ser anictérica, donde los síntomas son cefaleas, fiebre, mialgias, artralgias, en ocasiones exantema y en un 8% de los casos puede haber meningitis aséptica, y la icterica que normalmente es grave, también conocida como enfermedad de Weil, que se da en menor proporción y donde los síntomas son similares pero después se agravan debido al daño hepático y renal, resultando en ictericia, nefritis con disfunción renal, hemorragias pulmonares con hemoptisis, llegando a producir la muerte. La presentación dependerá entre otros factores, de si se establece la oportuna medicación, del estado inmune del hospedero y de la virulencia del agente infectante (Faine, 1999; Adler y De la Peña-Moctezuma, 2004).

En los animales domésticos, la infección por *Leptospira* se divide en dos categorías: la leptospirosis adaptada al hospedero, en la cual el animal infectado se comporta como hospedero de mantenimiento o reservorio y la leptospirosis no adaptada al hospedero. En el caso de las serovariedades adaptadas a una especie animal en particular, como sucede en el caso de la serovariedad Canicola en perros, Hardjo en bovinos, Bratislava y Pomona en cerdos, se producen cuadros generalmente asintomáticos o subclínicos. El reservorio puede mantener a la bacteria durante largos periodos de tiempo incluso durante toda su vida, los roedores son los reservorios mas importantes de la leptospirosis. En el caso de la leptospirosis no adaptada al hospedero, esta se origina por una exposición de un animal susceptible a una serovariedad no adaptada, dándose una infección accidental, como sucede en los humanos en quienes no hay serovariedad adaptada a la especie. Es importante mencionar que las serovariedades se comportan de forma diferente en un hospedero de mantenimiento que un hospedero accidental y por lo general la signología y las lesiones son más graves en un hospedero accidental. En los animales domésticos se puede tener una presentación aguda o crónica cursando con una variada signología como fiebre intermitente, infertilidad, abortos, ictericia, disminución de peso y de la producción láctea, insuficiencia hepática, insuficiencia renal, neumonía y meningitis (Ellis, 1986; Little, 1986). En el caso de animales silvestres la presencia de *Leptospira* se considera endémica y que se transfiere de animal a animal de forma

vertical y horizontal, algunos de estos son considerados reservorios como las zarigüeyas, mapaches, nutrias y comadrejas principalmente (Nieto, 2001; Ruiz *et al.*, 2002; OMS, 2008).

Dentro de los animales denominados reservorios u hospederos de mantenimiento, se considera que las ratas (*Rattus rattus* y *R. norvegicus*), los ratones (*Mus musculus*) y otros roedores son los responsables más frecuentes del mantenimiento de leptospirosis en el ambiente (Lemarroy y Carrillo, 2003).

Tanto en el humano como en los animales, se considera que el periodo de incubación es de 2 a 30 días, siendo más común entre 5 a 14 días, tiene dos fases: la leptospiremia, cuando el microorganismo se encuentra en sangre que tarda de 3 a 10 días y la leptospiruria que puede durar desde una semana hasta por varios meses o años, donde el microorganismo se aloja en riñón y es eliminado a través de la orina, de manera intermitente. La transmisión entre humanos se puede dar de la madre al feto a través de la placenta y la leche o por transmisión sexual, aunque estos casos se han reportado como anecdóticos. La similitud de los síntomas presentes en la leptospirosis con varias enfermedades febriles hace que se confunda con otras entidades como dengue o rickettsiosis (OMS, 2008).

2.3 Patogenia e Inmunidad

El curso de la enfermedad depende de la calidad del sistema inmune y edad del huésped, así como de la virulencia de la cepa de *Leptospira* patógena que lo afecte, esto puede producir cuadros de septicemia, endotoxemia, hemorragias, hepatitis, nefritis, meningitis, iridociclitis, aborto, nacimiento de animales prematuros o débiles, retención placentaria e infertilidad (Faine, 1999; Ellis, 1986).

Después de la entrada del microorganismo por heridas o laceraciones cutáneas o piel reblandecida por humedad excesiva o bien por mucosas (Faine, 1999; Ellis, 1986), ocurre la invasión de la sangre y los tejidos, favorecido probablemente por la capacidad de adhesión de la bacteria a la matriz extracelular de las células del hospedero, aunque esto sólo se ha demostrado *in vitro* en cultivos celulares a partir de

endotelio, fibroblastos, epitelio renal, monocitos y macrófagos (Merien *et al.*, 1997; Merien *et al.*, 1998; Thomas e Highble, 1990).

Se han logrado identificar algunas proteínas ubicadas en la membrana externa de *Leptospira* a las cuales se les atribuye la función de adherirse a algunas estructuras de la matriz extracelular, como una proteína de unión a la fibronectina de 36 kDa, proteínas de unión a la laminina Lsa24 y Lsa21, colágeno VI y fibronectina, proteínas similares a LigA y LigB que son también proteínas de unión a fibronectina, comparables a las FnBPA y FnBPB de *Staphylococcus aureus*, los cuales se unen a fibronectina, fibrinógeno y elastina (Barbosa *et al.*, 2006; Choy *et al.*, 2007; Atzingen *et al.*, 2008).

La endostatina, parecida a la proteína A (LenA), se une al plasminógeno humano, dada esta unión puede ser convertida a plasmina y luego puede degradar la fibrina, esto sugiere que la adquisición de derivados de la plasmina por LenA puede ayudar a la difusión de *Leptospira* a través de los tejidos del hospedero, esta proteína LenA tiene otras funciones como la unión a laminina y al factor H regulador de la cascada del complemento (Verma *et al.*, 2010). La unión de proteínas de superficie de *Leptospira* a los proteoglicanos de la superficie celular del hospedero ha sido reportada (Breiner *et al.*, 2009). Algunas proteínas de superficie solo se expresan en leptospiros virulentas y algunas sólo bajo condiciones fisiológicas de temperatura, pH, osmolaridad y la presencia de suero (Patarakul *et al.*, 2010). En hospederos animales la presencia de los proteoglicanos en el epitelio del túbulo renal facilita la colonización por *Leptospira*, se propone que a estos proteoglicanos se une una glicolipoproteína de 30 kDa, induciendo efectos tóxicos a través de su porción lipídica, perforando la matriz celular con la salida de componentes bacterianos y muerte celular (Vinh *et al.*, 1986). Experimentalmente, se ha observado que en células epiteliales de los túbulos contorneados proximales de riñón de conejo, esta glicolipoproteína forma una biopelícula inhibiendo la actividad de la ATPasa que participa en la bomba de sodio y potasio de una manera dosis-dependiente (Ristow *et al.*, 2009). También en cobayos infectados con leptospiros patógenas, la glicolipoproteína fue detectada adherida a células endoteliales de los tejidos dañados

y de la membrana de células epiteliales junto con otros antígenos, después de la destrucción de *Leptospira* por los elementos del sistema inmune como anticuerpos IgM los que actúan como opsoninas para que las bacterias sean fagocitadas, la lisis bacteriana esta dada por la acción del complemento (Faine, 1999). Se reportó que una preparación a partir de peptidoglicano de la serovariedad Copenhageni indujo la producción de (TNF- α) Factor de Necrosis Tumoral alfa de células mononucleares de sangre periférica, la elevación de los valores de TNF- α en la fase aguda de la enfermedad, se relacionan con la severidad del daño (Estavoyer *et al.*, 1991; Taijiki y Salomao, 1996).

Las leptospiras se pueden encontrar en sangre a los pocos minutos y al tercer día en órganos de animales después de la infección, llegando a una cuenta de 10^6 - 10^7 microorganismos por mililitro (Faine, 1999; Truccolo *et al.*, 2001). Por lo tanto, la evasión de *Leptospira* a la respuesta inmune innata del hospedero principalmente se da mediante la fagocitosis y el complemento en las etapas iniciales de la infección,. Uno de los receptores involucrados en la adhesión de la bacteria a los neutrófilos es el receptor de complemento CR3, este tiene un dominio de unión a fibronectina, esto confirma la capacidad de unión de las leptospiras a la fibronectina (Cinco *et al.*, 2002; Merien *et al.*, 2000).

Una vez fagocitada, la muerte intracelular se da principalmente por los péptidos catiónicos independientes de oxígeno de los neutrófilos y por la presencia de anticuerpos específicos (Scocchi *et al.*, 1993; Sambri *et al.*, 2002). Las leptospiras tienen cierta predilección por células del sistema nervioso central (SNC), algunos estudios muestran la interacción de estas bacterias con las células de la microglia. Células murinas de la microglia BV2 son capaces de internalizar a la bacteria, pero no matan a leptospiras patógenas en condiciones no opsonizantes. Los monocitos son estimulados por las lipoproteínas presentes en la bacteria para activación de moléculas como NF- κ B (Factor nuclear Kappa-b, factor de transcripción para linfocitos T y B) y fosforilación de la quinasa p38, que forma parte de MAPK_S (proteínquinas activadas por mitógenos), las cuales son activadas por la presencia de citosinas proinflamatorias y lipopolisacárido bacteriano, participan también en la

señalización para la diferenciación celular de células T, así como la liberación de óxido nítrico y citocinas, desencadenando la liberación de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 e IL-12 (Cinco *et al.*, 2006; Blasi *et al.*, 2007; Klimpel *et al.*, 2003; Vernel.Pauillac y Merien, 2006; Abbas, 2008; Ono y Han 2000).

Algunos componentes de la bacteria como el peptidoglicano y el LPS son capaces de inducir la liberación del TNF- α . El LPS de *Leptospira* es considerado el principal antígeno de superficie, dentro de su estructura se encuentran hexosas comunes, aminohexosas, pentosas y otros carbohidratos como arabinosa y xilosa, azúcares metilados y acetilados también han sido reportados (Yanagihara *et al.*, 1983). El ácido cetodeoxioctanoico (KDO) encontrado en el LPS de las serovariedades Copenhageni y Hardjo es similar al encontrado en otros LPS de bacterias Gram negativas (Jost *et al.*, 1986; Vinh *et al.*, 1989), sin embargo el LPS de *Leptospira* es menos tóxico para las células animales que el de otras bacterias con similar composición estructural y bioquímica. Aun así, funciona como activador de macrófagos a través de los receptores CD14 y TLR2, en lugar del receptor TLR4 activado con el LPS de otras bacterias Gram negativas (Werts *et al.*, 2001), esto se ha correlacionado con el radical 1-metil fosfato ausente en el lípido A de otras bacterias (Que-Gewirth *et al.*, 2004). La actividad hemolítica de *Leptospira* está dada por las proteínas de tipo hemolisinas, una esfingomielinasa C codificada por el gen *sphA*, identificada en la serovariedad Hardjo, subtipo Hardjobovis, se han encontrado secuencias similares en todas las cepas patógenas analizadas, por el contrario en serovariedades no patógenas, no se encontró este tipo de secuencias (Segers *et al.*, 1992). En ensayos de hibridación y experimentos de clonación, se han identificado por lo menos otros siete genes similares a *sphA* en algunas especies patógenas de *Leptospira*. Se postula que la esfingomielinasa SphH reportada en la serovariedad Lai, forma parte de la familia de las hemolisinas formadoras de poro o perforadoras (Lee *et al.*, 2000).

El complemento es un importante componente del sistema inmune innato involucrado en la protección contra la invasión de microorganismos por sus actividades inflamatorias, opsonización y lisis celular (Bloom, 2002). En el caso de *Leptospira* la

resistencia al complemento se relaciona con la capacidad de la bacteria a unirse al factor H, FHR-1 (proteína relacionada al factor H-1), el cual regula la vía alterna del complemento evitando la unión del factor B a C3b, acelerando la decadencia de la C3-convertasa de C3bBb y actuando como cofactor para la escisión de C3b por el factor I (Meri *et al.*, 2002). Las proteínas de membrana externa de *Leptospira* que participan en la unión al factor H se han denominado LenA (endostatina de *Leptospira* proteína A) antes llamada LfhA (adhesina de superficie al factor H de *Leptospira*) y LenB (Barbosa *et al.*, 2006; Verma *et al.*, 2010; Verma *et al.*, 2006).

LenA también mostró unión a componentes de laminina (Stevenson *et al.*, 2007), esta familia de proteínas como Len B, C, D, E y F presentan afinidad a la fibronectina, por lo cual se considera que estos componentes de la superficie de la bacteria favorecen la invasión y la colonización. Los hallazgos recientes indican que leptospiras patógenas son capaces de unirse a C4BP del suero, mientras que la cepa apatógena Patoc 1 no se une (Barbosa *et al.*, 2009). C4BP es un regulador de la cascada del complemento, que desempeña un papel clave en la vía clásica interfiriendo con el ensamblaje de la convertasa de C3 y actuando como un cofactor para el factor I en la inactivación proteolítica de C4b (Gigli *et al.*, 1979). Por lo tanto C4BP unido a la superficie de *Leptospira* compite con el factor C2 por la unión a C4b, disocia la convertasa de C3 y promueve la escisión de C4b mediante factor I, esta interacción contribuye aún más para la resistencia de *Leptospira* al complemento a través de la vía clásica. Las cepas de *Leptospira* resistentes al complemento mantienen la expresión de los ligandos de C4BP y del factor H, al igual que otros microorganismos como *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans* y otras espiroquetas como *Borrelia recurrentis* y *Borrelia duttonii* (Barbosa, 2009).

Algunas de las proteínas de membrana externa (PME) de *Leptospira* son conservadas y por lo tanto pueden inducir una inmunidad heteróloga. Pocas PME han sido identificadas en cuanto a su función, sin embargo de algunas como OmpL1 se ha descrito como una porina (Shang *et al.*, 1995); de otras como OmpL36, OmpL37, OmpL47 y OmpL54 todavía no se ha identificado su función (Haake y Matsunaga, 2002; Pinne y Haake, 2009).

Las lipoproteínas juegan un papel importante como factores de virulencia hacia los tejidos del hamster, se ha detectado la expresión de algunas proteínas de membrana externa durante la infección renal en estos animales (Barnett et al., 1999).

En el genoma de *Leptospira* se han detectado aproximadamente 145 genes que codifican para la expresión de supuestas lipoproteínas extracelulares y proteínas de membrana externa (Setubal et al., 2006).

La lipoproteína LipL32 representa el principal componente del proteoma de la membrana externa, es altamente conservada y es expresada por leptospiros patógenas durante la infección letal aguda (Nally et al., 2007). Se encontró que su región C'-terminal se une a la laminina, al colágeno II, IV, V y a la fibronectina del plasma (Hoke et al., 2008). LipL32 se denominó previamente como la hemolisina Hap1 (Lee et al., 2000). Loa22 es una proteína de superficie (tiene un dominio terminal similar a OmpA), se comporta como un factor de virulencia, produciendo una respuesta inmune en humanos (Nally et al., 2007) y se regula durante la infección aguda uniéndose ligeramente a la matriz extracelular. La mutación del gen *loa22* por inserción del Fagémido Himar 1, provoca la pérdida de virulencia en cobayos (Ristow et al., 2007). LenA, B, C, D, E y F son proteínas involucradas en la invasión y la colonización (Barbosa et al., 2006; Verma et al., 2010; Verma et al., 2006) (Figura 2).

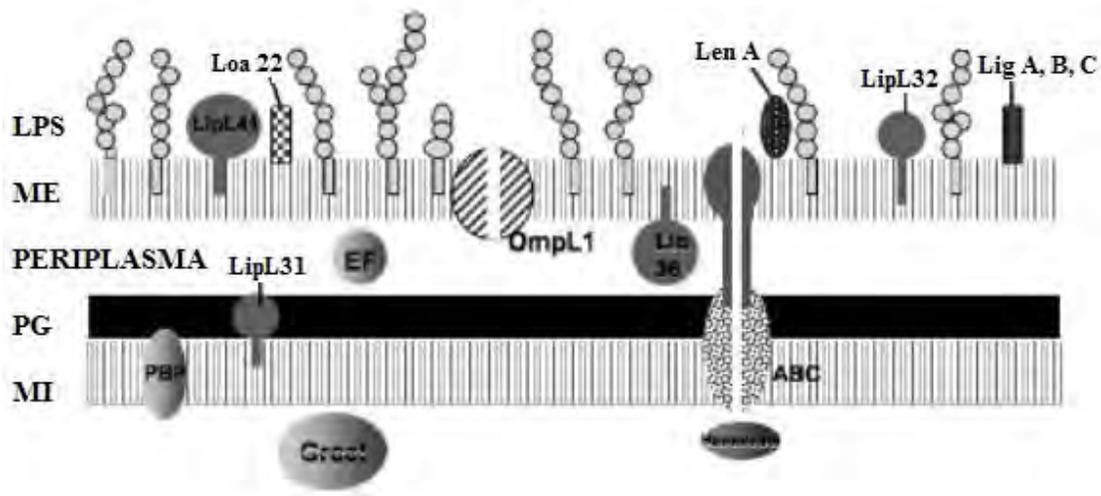


Figura 2. Las proteínas y lipoproteínas en las membranas de *Leptospira*. MI= membrana interna, PG=péptidoglicano, ME=membrana externa, LPS=lipopolisacárido. Proteínas GroEL, el flagelo periplásmico EF, las lipoproteínas de LipL31, las proteínas fijadoras de penicilina PBP. El ME contiene a las proteínas OmpL1 porina. El sistema de secreción tipo 1 está representado por la proteína transmembranal TolC, formando un complejo con la ATP vinculante y el sistema transportador ABC que participa en la exportación de componentes citoplasmáticos como hemolisina. LipL41, LipL36, LipL32, Len A, Lig A, B, C, son proteínas de la superficie externa (modificado de Nascimento *et al* 2004).

LigA, B, C, son proteínas de superficie de *Leptospira* miembros de la superfamilia de proteínas bacterianas similares a inmunoglobulinas que median la interacción a través de la adhesión e invasión a las células del hospedero, estas sólo se han encontrado en leptospiros patógenas (Choy *et al.*, 2007).

Las proteínas Lig están ancladas a la membrana externa tienen 12 a 13 dominios repetidos en tándem, estos se adhieren fuertemente a la matriz extracelular, incluyendo fibronectina, fibrinógeno, colágeno y laminina (Lin y Chang, 2007). Sus genes son regulados en una osmolaridad fisiológica baja y las proteínas de superficie son reconocidas por los sueros de pacientes con leptospirosis (Croda *et al.*, 2007; Matsunaga *et al.*, 2007), estas proteínas confieren un alto nivel de protección cruzada cercana al 100% en ratones de la línea C5H/HeJ deficientes en la expresión de receptores TLR4. A pesar de que parecen ser los factores implicados en la virulencia, mutantes en los genes *ligB* y *ligA* no afectan la capacidad de los microorganismos para causar la infección aguda en animales de experimentación, por lo tanto, otras

adhesinas deben participar en cooperación con las proteínas Lig de *Leptospira* durante la infección (Koizumi y Watanabe, 2004).

2.4 Vacunas contra la leptospirosis.

En la actualidad, es un reto para los inmunólogos desarrollar una bacterina o vacuna eficaz y segura contra la leptospirosis, dado que la enfermedad afecta a diferentes especies domésticas como caninos, bovinos y porcinos por lo que las serovariedades presentes en estos biológicos son diferentes dependiendo la especie animal a la que son destinadas. Los estudios moleculares y celulares del microorganismo se han centrado en la movilidad bacteriana (Li *et al.*, 2009; Charon y Goldstein, 2002), el LPS (Zuerner *et al.*, 2000; Shimizu *et al.*, 1987; Jost *et al.*, 1989; Vinh *et al.*, 1989), las lipoproteínas (Cullen *et al.*, 2002), otras proteínas de membrana externa (Haake *et al.*, 1999; Haake *et al.*, 2000) y algunos posibles factores de virulencia (Gritton *et al.*, 1994; Nervig *et al.*, 1977; Ellinghausen *et al.*, 1976; Matsunaga *et al.*, 2002), esto ha proporcionado información sobre los posibles inmunógenos que podrían utilizarse en la preparación de vacunas capaces de inducir una protección duradera y de forma heteróloga (Haake *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2007). La inmunidad humoral es el tipo de respuesta inmune más estudiada en el caso de leptospirosis (Heath y Johnson, 1994; Thiermann 1984).

.El lipopolisacárido (LPS) es el principal componente antigénico de *Leptospira*, por lo cual ha sido usado como inmunógeno al utilizar cultivos bacterianos inactivados (bacterinas tradicionales), produce activación de macrófagos a través de los receptores CD14 y TLR2, también actúa como mitógeno en células B (Isogai *et al.*, 1990; Werts *et al.*, 2001). Los anticuerpos aglutinantes del tipo IgM reaccionan contra el LPS y son detectables en la prueba diagnóstica de aglutinación microscópica (Jost *et al.*, 1989), sin embargo esta respuesta es de corta duración.

Se han probado vacunas a partir de proteínas de membrana externa como OmpL1 y LipL41, en hámsteres sirios dorados demostrando ser parcialmente protectoras (70%) (Haake *et al.*, 1999). Las proteínas parecidas a inmunoglobinas (LigA), también han demostrado generar protección contra leptospirosis patógenas además de jugar un papel

importante en la fijación e invasión de las células del hospedero en la infección por *Leptospira* (Koiumi y Watanabe, 2004; Palaniappan *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2007). Otras proteínas han sido propuestas como candidatas a vacunas como LipL32, LipL45, LipL21 y LipL41 (Haake *et al.*, 2000; Guerreiro *et al.*, 2001).

En un estudio publicado se analizaron 27 antígenos recombinantes en hamsteres, encontrando respuesta inmune protectora en el caso de las proteínas clonadas a partir de LigA en los animales inmunizados que sobrevivieron al desafío con *L. interrogans* serovariedad Pomona (Felix *et al.*, 2011).

3. JUSTIFICACIÓN

Las bacterinas actuales generan protección contra la serovariedad específica por lo que inducen un estrecho margen de protección, además la inmunidad conferida es de corta duración (Koiumi y Watanabe, 2003; Srivastava, 2006). Las proteínas de membranas externas de leptospiras patógenas contienen proteínas que son altamente conservadas y el potencial para utilizarlas en la elaboración de vacunas, pudiera generar una inmunidad de protección cruzada y potencialmente de una mayor duración (Wang *et al.*, 2007; Haake *et al.*, 1999).

4. HIPÓTESIS

Una vacuna elaborada a partir de extractos de membranas externas de un aislado virulento de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola (cepa LOCaS46), generará una respuesta inmune en hámsteres capaz de proteger contra la infección con una cepa virulenta homóloga.

5. OBJETIVO GENERAL

Preparar cuatro vacunas a partir de extractos de membranas externas de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola de las cepas LOCaS46 virulenta, virulenta adicionada con adyuvante, no virulenta y de la cepa de referencia Hond Utrecht VI, para evaluar la respuesta inmune humoral inducida en hámsteres.

5.1 Objetivos específicos

- Desarrollar 3 vacunas a partir de extractos de membranas externas de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCas46, una de un cultivo virulento con y sin adyuvante y otra de un cultivo no virulento de la misma cepa.
- Desarrollar una vacuna a partir de extractos de membranas externas de *Leptospira interrogans*, serovariedad Canicola cepa Hond Utrecht IV (cepa de referencia).
- Evaluar la capacidad protectora de los inmunógenos mediante el desafío de los animales inmunizados con la cepa virulenta LOCaS46 serovariedad Canicola de *Leptospira interrogans*.
- Determinar, tanto en animales que sobrevivan al desafío como en los que mueran, el estado de portador mediante el cultivo de leptospiras y detección de ADN a partir de muestras de riñón e hígado por la prueba de PCR.
- Determinar por la prueba de inmunodetección tipo Western las proteínas inductoras de respuesta humoral en los hámsteres inmunizados.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Cepas utilizadas.

Se utilizaron las cepas de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola LOCaS46 (Castillo Sánchez, 2008), virulenta y no virulenta, así como la cepa de referencia Hond Utrecht IV, las cuales fueron cultivadas cada una en 100 ml de medio EMJH líquido modificado¹⁷, suplementado con 1% de fracción V de albumina sérica bovina. Se incubaron a 30°C hasta alcanzar una cuenta de 2×10^8 leptospiras/ml, las cuales fueron cuantificadas en una cámara de Petroff-Hausser.¹ La cepa LOCaS46 es un

¹ Hausser Scientific, Horsham, PA, USA.

aislado obtenido de tejido renal de un perro asintomático., la cepa de referencia Hond Utrecht IV fue obtenida como donativo del Royal Tropical Institute a través del Dr. Rudy Hartskeerl².

A partir de un cultivo en medio EMJH de la cepa LOCaS46 previamente activado (recuperación de la virulencia en hámster), se determinó la dosis letal en hámster al 50% (DLH_{50%}), primero se realizó el conteo de los microorganismos, obteniendo una cuenta inicial de 4.15×10^7 (41,500,000 leptospiras), después se realizaron diluciones decuples seriadas hasta llegar a 415 bacterias (dilución 10^{-5}), a partir de esta se hicieron las diluciones para obtener las cantidades inoculadas. Se utilizaron 4 grupos de 8 animales cada uno, se inocularon vía intraperitoneal en un volumen de 1 ml de medio EMJH que contenía 100 ($10^{-5.25}$), 10 ($10^{-6.25}$), 5 ($10^{-6.75}$) y 1 ($10^{-7.25}$) bacterias.

Se utilizó el método de Reed y Munch, obteniendo un título de $10^{6.96}$ DLH_{50%}/1 ml equivalente a 4.8 leptospiras (Castillo Sánchez y Ramírez Ortega, 2010).

6.2 Extracción de membranas externas.

Se utilizó el método descrito por Matsunaga (2003). Los cultivos de 10 a 14 días de desarrollo de las cepas de *Leptospira*, se centrifugaron en tubos³ de 30 ml a 10,000 xg en una centrífuga refrigerada⁴, durante 1 hora a una temperatura de 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 15 ml de solución amortiguadora de fosfatos (SAF) (Apéndice I), se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. El sedimento entonces fue resuspendido en 15 ml de SAF con 5 mM MgCl frío (2 a 4°C). La suspensión se distribuyó en 10 tubos de 1.5 ml tipo Eppendorf⁵ y se centrifugó a 10,000 xg en una centrífuga refrigerada⁶ a 4°C, durante 2 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las pastillas en 450 µl de solución inhibidora de proteasas (2X TNE-PI) (Apéndice I), más 450 µl de agua desionizada

² Comunicación Personal

³ Nalgene, Rochester NY, USA.

⁴ Jouan Modelo MR-1812

⁵ Axigen California, USA.

⁶ Savant Modelo SF13K

estéril; se homogenizaron las muestras y se colocaron en hielo, para después hacer la extracción de las proteínas con detergente Triton X-114. A cada tubo se le agregaron 100 μ l de Tritón X-114⁷ al 10% frío (Apéndice I), incubando durante 30 minutos a 4°C en un agitador orbital. Las muestras fueron después centrifugadas a 10,000 xg, durante 2 minutos a 4°C. El sobrenadante de cada tubo, aproximadamente 1 ml fue transferido a otro tubo con 20 μ l de 1 M CaCl₂ (Apéndice I) y mezclado con 100 μ l más de Tritón X-114⁶, al 10 % frío, esta mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos para separar las fases detergente (botón) y acuosa (sobrenadante). Finalmente, se centrifugaron durante 10 minutos a 2,000 xg a temperatura ambiente. Se separaron las fase acuosa (FA) y la detergente (FD). Posteriormente, se procedió al lavado de ambas fracciones, a la FA se le adicionaron 200 μ l de Tritón X-114 frío al 10 % y a la FD se le agregaron 800 μ l de 1x TNE-PI frío. Ambas mezclas se incubaron a 37°C durante 10 min, después se centrifugaron a 2,000 xg durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante de la FA se transfirió a nuevos tubos. Se eliminó el sobrenadante de la FD y se recuperó el sedimento. Se precipitó con acetona fría⁸, adicionando 1 y 3 volúmenes a la FA y a la FD respectivamente, se homogenizaron con un agitador⁹ y después se mantuvieron en agitación a 4°C durante toda la noche. Para finalizar se centrifugaron los extractos a 13,000 xg durante 15 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante de ambas fases, se dejaron secar completamente los tubos y se resuspendieron las pastillas en 100 μ l de solución amortiguadora final de muestra AFM/0.25 mM de PMSF (fluoruro de fenil metil sulfonilo) (Apéndice I). Obtenidos los extractos de membrana externa se cuantificó el contenido proteico por el método Micro BCA Protein Assay Kit¹⁰. Los extractos obtenidos se concentraron utilizando el sistema Amicon Ultra 30,000 MWCO¹¹, se colocaron 4 ml de los extractos en un tubo del sistema de filtración con un punto de corte de 30 kDa, al finalizar las proteínas quedaron concentradas en 500 μ l.

⁷ ICN California, USA.

⁸ JT Baker

⁹ Vortex Termolyne Maxi-Mix Plus

¹⁰ Pierce Rockford IL, USA.

¹¹ Millipore Billerica MA, USA.

6.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE).

De los 3 extractos obtenidos y cuantificados de las cepas de referencia Hond Utrecht IV, LOCaS46 virulenta y LOCaS46 no virulenta, se tomó una muestra de 11.6, 19.2 y 16.6 μl lo que equivale a una concentración de 50 μg de cada una, se suspendieron en solución amortiguadora de muestra (Apéndice I) en relación 1:1, se mantuvieron en ebullición durante 5 min en baño María¹² a una temperatura de 100°C, después fueron centrifugadas a 13,000 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. Primero se preparó un gel desnaturalizante de poliacrilamida-SDS al 12 % (gel separador), se dejó polimerizar durante 30 minutos a temperatura ambiente, después se preparó un gel al 4% (gel concentrador), ambos con un grosor de 0.75 mm. Tanto las soluciones amortiguadoras como la concentración de los geles se realizaron de acuerdo a la técnica de Laemmli (1970) (Apéndice I). Los geles se colocaron en una cámara para electroforesis vertical¹³, se llenó la cámara con la solución amortiguadora para corrimiento (Apéndice I). Se utilizó el marcador de peso molecular¹⁴ para comparar los pesos moleculares de los extractos de proteínas. Para separar las proteínas se utilizó un voltaje de 50 volts para el gel concentrador y de 100 volts para el gel separador durante 1 y 2 horas respectivamente. Al finalizar la electroforesis, el gel fue teñido en azul de Coomassie (Apéndice), manteniéndolo en inmersión durante toda la noche en agitación a temperatura ambiente, después se retiró la tinción y se decoloró con solución desteñidora (Apéndice), cambiando la solución hasta la decoloración del gel. Posteriormente, se enjuagó con agua destilada tres veces y se secó el gel en un bastidor con papel celofán dulce para su registro fotográfico y conservación.

6.4 Preparación de los inmunógenos.

Obtenidos, concentrados y cuantificados los extractos de membranas externas, se ajustó la concentración proteica de las 3 cepas para los inmunógenos a razón de 50 $\mu\text{g}/250\mu\text{l}$ de SSF por vacuna, de acuerdo a un estudio previo de inmunoprotección en hámsteres (Rodríguez Reyes, 2007). Para la vacuna con adyuvante, los extractos de la

¹² Fisher Scientific IW

¹³ BioRad Mod. Mini-Protean II Cell, Hercules CA, USA

¹⁴ BioRad Precision Plus Protein Standars Hercules CA, USA

cepa LOCaS46 virulenta se mezclaron con hidróxido de aluminio (AlOH₃)¹⁵ a una concentración de 1 mg/ml por agitación durante toda la noche a temperatura ambiente. Se realizó la prueba de esterilidad para verificar que la vacuna estuviera libre de microorganismos contaminantes, sembrando en Agar Sangre, Agar Sabouraud y en caldo Tioglicolato, incubando las siembras a 37°C durante 5 días. Por cada vacuna elaborada se realizó también la prueba de inocuidad inoculando 2 cuyos de un peso de 250g por vía subcutánea, con 1 ml del producto terminado, los cuyos fueron observados durante 7 días después de la inoculación.

6.5 Vacunación.

Se utilizaron 60 hámsteres de la raza sirio dorado (*Mesocricetus auratus*), de 8 semanas de edad de aproximadamente 90 g. de peso. Se ordenaron en 6 grupos de 10 ejemplares cada uno (cuadro 1). Se utilizó un sistema de identificación con base en muescas realizadas en las orejas de los hámsteres (figura 4).

Cuadro 1. Grupos de hámsteres utilizados. EME= extractos de membranas externas. SSF=solución salina fisiológica.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6 (-)
EME cepa virulenta Canicola LOCaS46	EME cepa no virulenta Canicola LOCaS46	EME cepa de referencia Canicola Hond Utrecht IV	EME cepa virulenta Canicola LOCaS46 + adyuvante (Hidróxido de Aluminio 1mg/ml)	Testigo A Adyuvante (AlOH ₃ 1 mg/ml) en SSF	Testigo B Solución salina fisiológica

Todos los hámsteres se inocularon por vía subcutánea, de los grupos 1 al 4 se inmunizaron con una dosis de 50 µg de proteínas de membrana externa (Rodriguez Reyes, 2008) en 0.25 ml de solución salina fisiológica (SSF). El quinto grupo (testigo A) se inoculó solo con hidróxido de aluminio en relación de 1mg/ml en 0.25 ml de SSF, el sexto grupo (testigo B) se inoculó solo con 0.25 ml de SSF. Se realizaron dos inmunizaciones con 14 días de diferencia entre cada una. Se colectaron muestras para evaluar los títulos de anticuerpos antes de inmunizar (día cero) y 14 días después de cada inmunización (días 14 y 28). Los animales fueron desafiados 14 días después de la segunda inmunización, inoculando 1,000 dosis letales 50% en hamster (DLH50%)

¹⁵ Sigma St. Louis MO, USA.

de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS 46 virulenta (4,800 leptospiras) en 0.5 ml de medio EMJH. El desafío se hizo vía intraperitoneal. Los animales se observaron durante los siguientes 14 días después del desafío, llevándose un registro de todos los animales muertos. La prueba se consideró satisfactoria cuando el 80 % de los animales vacunados sobrevivió al desafío y el 80 % de los animales del grupo testigo (SSF) murió. A los animales sobrevivientes después del día 42 se les aplicó la eutanasia. Para evaluar si la vacuna indujo una respuesta inmune contra la serovariedad homóloga, se determinó el título de anticuerpos mediante las pruebas de AM y ELISA indirecta e isotipo de inmunoglobulinas estimulado por la vacunación y comparándolo con los datos obtenidos previos a la inmunización. Para corroborar que los animales inmunizados y desafiados murieron debido a la infección producida por *Leptospira*, se colectaron muestras de riñón e hígado para su cultivo en medio Fletcher y para la extracción de ADN para detección por la prueba de PCR. Se realizó una inmunotransferencia para determinar cuales proteínas de membranas externas estimularon una respuesta inmune en los hamstres.



Figura 3. Identificación basada en muescas en el borde de la oreja. A. Oreja derecha los numeros 1, 2, 3, oreja izquierda 4, 5, 6. B y C. Los numeros 7, 8, 9 y 10, con muesca en la oreja del lado izquierdo (6) y con muesca en la oreja del lado derecho que corresponde a los numeros 1, 2 y 3. Ejemplo el hamster 10 tendria muesca en la parte inferior de la oreja izquierda (6) y en la parte superior de la misma oreja (4)=10.



Figura 4. Esquema que indica los muestreos previos a las inmunizaciones y el desafío.

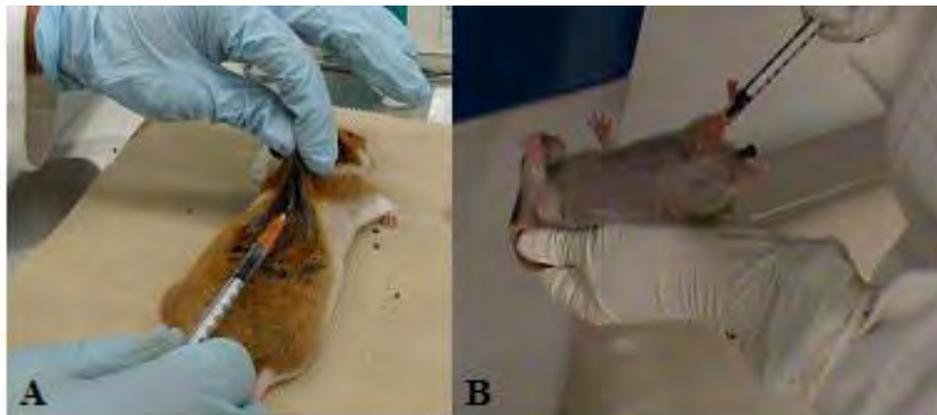


Figura 5. A. Inmunización vía subcutánea y B. Desafío vía intraperitoneal con la cepa LOCaS46 virulenta de *L. interrogans* serovariedad Canicola.

6.6 Colección de muestras

De los 6 grupos se colectaron muestras de sangre en el día cero y antes de los procedimientos de inmunización, primero se anestesiaron los hámsteres utilizando pentobarbital sódico en dosis de 70 mg/kg de peso vivo, vía intraperitoneal. Ya anestesiados se obtuvo la muestra vía intracardiaca, aproximadamente 1.5 ml, después se procedió a inmunizarlos, la sangre se dejó coagular, para obtener el suero el cual se separó en tubos tipo Eppendorf, conservándolo en congelación a -20°C hasta su uso. De los animales muertos después del desafío y de los animales con signología similar a la producida por leptospirosis, se obtuvieron las muestras de riñón e hígado, para procesarlas para aislamiento y PCR, y de sangre, cuando fue posible para pruebas serológicas. Primero se procedió a abrir a los hámsteres, previa eutanasia, todo se realizó al mechero y con los procedimientos de asepsia y desinfección, se colocó el hámster en posición decúbito dorsal fijándolo con cinta adhesiva, se utilizó alcohol al 70% como antiséptico para la superficie a incidir, se incidió al hámster para exponer cavidad torácica y abdominal, los cortes se realizaron utilizando tijeras rectas y pinzas de disección, primero se obtuvo si era posible muestra de sangre con jeringa de 3 ml, para después obtener el suero y conservarlo. Después, se extrajo uno de los riñones, este se colocó en una jeringa de 10 ml a la cual primero se le quitó el émbolo, colocando el órgano dentro de la jeringa, esto para obtener un macerado del órgano, de la misma forma se obtuvo una porción de hígado, colocándolo en una jeringa de 5 ml. Al final, en los animales en los que se encontró orina en vejiga, se obtuvo la muestra con jeringa para insulina. Se realizó observación de campo oscuro de las muestras de sangre, hígado, riñón y orina, primero se colocó una gota de medio EMJH estéril en un portaobjetos para después colocar una gota de cada una de las muestras y así diluir la muestra para facilitar la observación (figura 6).

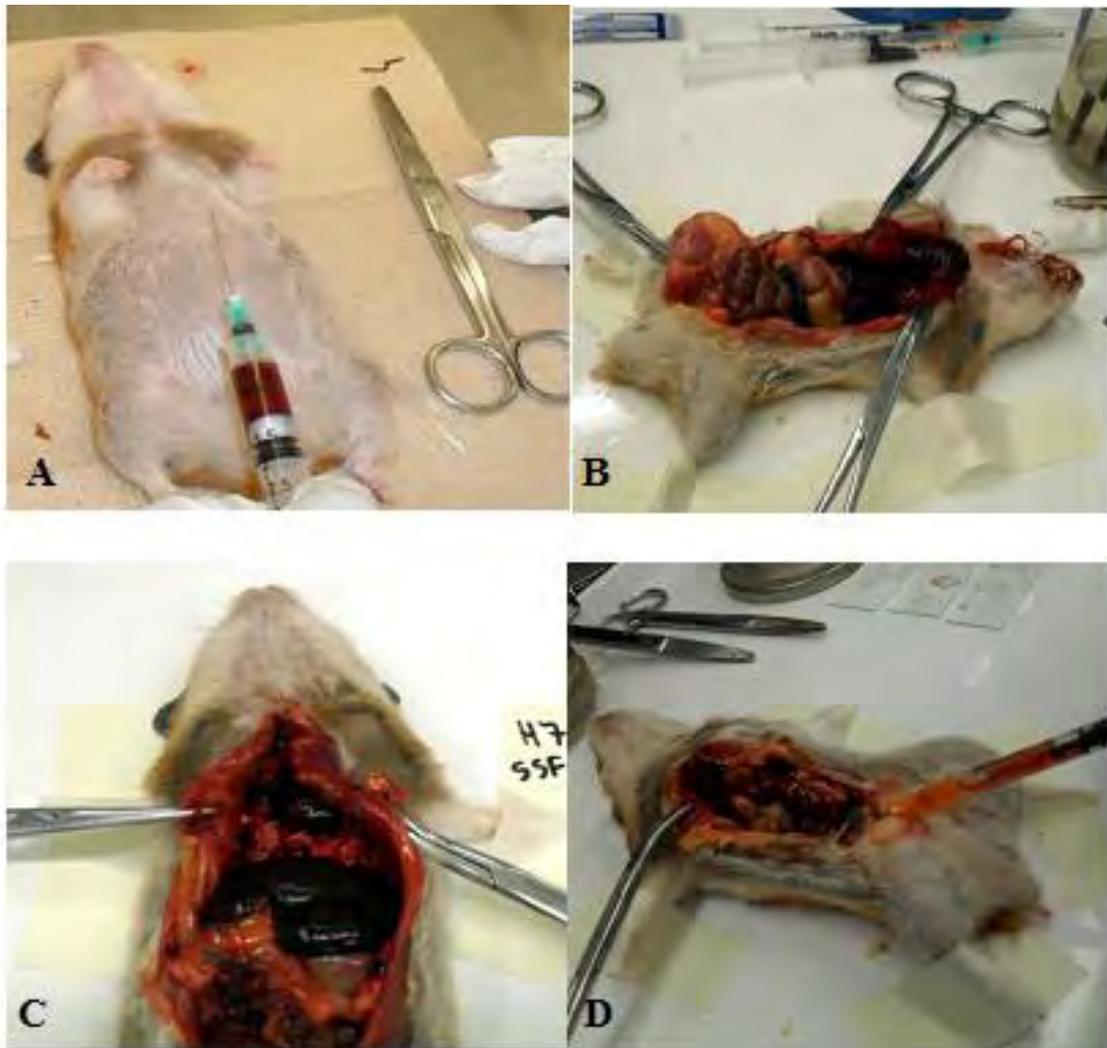


Figura 6. A. Toma de muestras: de sangre para obtener suero. B y C. De órganos durante la necropsia y D. De orina para observación en campo oscuro.

6.7 Evaluación de la respuesta inmune humoral.

6.7.1 Aglutinación microscópica (AM)

Para la realización de esta prueba se ocupó un cultivo de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa Hond Utrecht IV (cepa de referencia), en de medio líquido EMJH y con un desarrollo similar a la turbidez de 0.5 en la escala de McFarland. Se realizaron las diluciones de los sueros de los hámsteres de los 4 muestreos a partir de 1:5 (100 μ l de suero y 400 μ l de SAF), se utilizaron placas de 96 pozos de fondo plano.¹⁶ Se hicieron diluciones a partir de 1:10 hasta la dilución 1:1,280. En una placa nueva se agregaron 50 μ l de la dilución 1:5 del suero 1 en el primer pozo de la fila A, y así sucesivamente con los demás sueros hasta completar las 12 pozos de la primera fila, de modo que por placa se trabajaron 12 sueros. Después se agregaron 50 μ l de SAF a todos los pozos de la placa, se hicieron las diluciones, eliminando al final 50 μ l de la última dilución. Se agregaron 50 μ l del antígeno en todos los pozos, se agitó suavemente y se incubó a 30°C durante 90 minutos y transcurrido el tiempo se revisó en un microscopio de campo oscuro (CO)¹⁷, con un objetivo corto de 10X (figura 7).

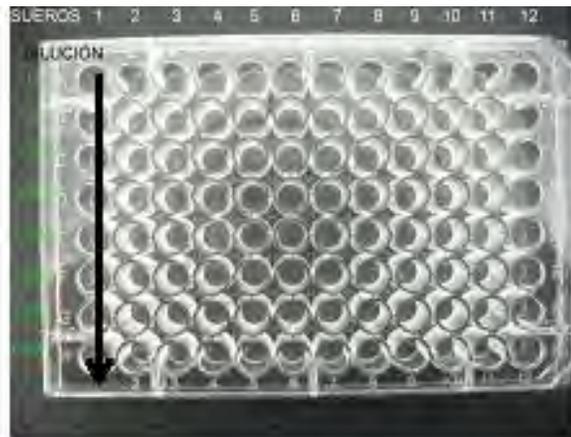


Figura 7. Placa de 96 pozos mostrando la forma de colocar las diluciones de los sueros para aglutinación microscópica.

¹⁶ Evergreen Los Angeles CA, USA.

¹⁷ Leika Wetzlar, Germany .

6.7.2 ELISA indirecta

Para la realización de la prueba de ELISA, se utilizaron los sueros de los hámsteres antes de inmunizar, dos muestras más durante las inmunizaciones y una última muestra después del desafío con la cepa virulenta LOCaS46 de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola. Los sueros negativos se obtuvieron de animales no inoculados y que no mostraron título de anticuerpos contra *Leptospira* en la prueba de aglutinación microscópica. Para la sensibilización de las placas se utilizaron cultivos de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa Hond Utrecht IV (cepa de referencia). Se realizaron cultivos en 200 ml de medio EMJH líquido, se incubaron a 30°C hasta alcanzar una cuenta de 2×10^8 microorganismos/ml, el conteo fue realizado en una cámara de Petroff Hausser¹⁸. Se ajustó la cantidad de bacterias para tener 10 ml con una concentración de 2×10^6 leptospiras/ml de SSF, los cuales se distribuyeron a razón de 100 µl por pozo (200,000 leptospiras), en las placas de 96 pozos de fondo plano¹⁹. Se incubaron toda la noche a 4°C para fijar a las placas, después se lavaron agregando 200 µl de solución de lavado (Apéndice I), agitando durante 5 minutos a 15 RPM, este lavado se repitió 5 veces. Después, se agregaron 200 µl de solución de bloqueo (Apéndice I) y se incubó durante 1 hora a 37°C, se realizó 1 lavado más. Las placas se escurrieron y se ocuparon inmediatamente. Para la prueba de ELISA, se agregaron los sueros tanto positivos como negativos en una dilución de 1/200 para la detección de IgG, y de 1/100 para la detección de IgM. Esto se determinó durante la estandarización de la prueba, en la cual se probaron diluciones de los sueros desde 1:10 hasta 1:20480. Se incubó a 37°C durante 1 hora, se hicieron dos lavados antes de agregar 100 µl del conjugado diluido 1/15,000 con anticuerpos monoclonales de conejo anti-IgG²⁰ o anti-IgM²¹ de hámster sirio dorado marcados con peroxidasa, se incubaron durante 1 hora a 37°C y posteriormente se hicieron 3 lavados con solución de lavado, después se agregaron

¹⁸ Hausser Scientific, Horsham, PA, USA.

¹⁹ Evergreen Los Angeles CA, USA.

²⁰ Jackson Immuno Research West Grove PA, USA.

²¹ Rockland Gilbertsville PA, USA.

100 µl a cada pozo del cromógeno OPD (ortofenilendiamina).²² Se cubrieron las placas y se incubaron durante 30 minutos a 37°C, pasado este tiempo, se agregaron 100 µl de la solución de frenado de ácido clorhídrico 1N (Apéndice I) a cada pozo. Las placas se leyeron a una absorbancia de 490 nm en un lector de ELISA²³ (Céspedes *et al.*, 2002).

6.8 Aislamiento.

De todos los animales se colectaron muestras de riñón e hígado de forma aséptica, las cuales fueron maceradas en jeringas e inoculadas en medio semisólido Fletcher (Apéndice I), en dos tubos donde se hicieron diluciones décuples hasta 1:100. Se incubaron los tubos a 30°C y se revisaron semanalmente hasta por 3 meses después.

6.9 Reacción en cadena de la Polimerasa.

De las muestras de riñón e hígado se tomaron 25 mg aproximadamente de tejido macerado y a partir de este se hizo la extracción de ADN con el paquete comercial QIAamp DNA Mini Kit,²⁴ siguiendo el protocolo señalado por el fabricante. Se colocó el tejido previamente congelado en un tubo plástico de 1.5 ml tipo Eppendorf (Axigen®), se le agregaron 180 µl de la solución amortiguadora ATL® y 20 µl de Proteinasa K (40 mg/ml), se mezclaron completamente y se incubaron a una temperatura de 56°C en baño María hasta completar la lisis del tejido (de 1 a 3 horas). Después, se mezclaron nuevamente y se adicionaron 200 µl de la solución amortiguadora AL®, se mezclaron durante 15 segundos y se incubaron a 70°C durante 10 minutos. Se adicionaron 200 µl de etanol al 100 % y se mezclaron hasta obtener una solución homogénea. Se pasó toda la solución a través de una columna QIAamp Spin®, con un tubo de 2 ml provistos en el paquete. Se centrifugó a 6,000 xg, durante 1 minuto. La columna fue transferida a otro tubo limpio y se adicionaron 500 µl de la solución amortiguadora AW1®, nuevamente se centrifugaron durante 1 min. Se transfirió la columna a otro tubo limpio y se

²² Sigma St. Louis MO, USA.

²³ Universal Microplate Reader Bio-Tek Instrument INC Mod. ELX800

²⁴ Quiagen, Ventura, CA, Estados Unidos de America.

adicionarán 500 µl de la solución amortiguadora AW2®, se centrifugaron entonces a 20,000 xg, durante 3 minutos. Se colocó la columna en un tubo tipo Eppendorf de 1.5 ml y se le agregaron 200 µl de la solución amortiguadora AE®, se incubaron 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 6,000 xg durante 1 min. La solución obtenida contenía el ADN extraído y purificado de la muestras. Se realizó la medición del ADN extraído con un espectrofotómetro²⁵.

6.10 Detección de *Leptospira* mediante la prueba de PCR

Se utilizaron un par de oligonucleótidos previamente diseñados para la detección de leptospiras patógenas que amplifica un fragmento de 258 pb del gen de *secY* (que codifica para una preproteína del sistema Sec), para la especie *L. interrogans*. Los iniciadores son GI iniciador adelantado con la secuencia de 20 pb (5'CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT3') y GII iniciador reverso (5'GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG3') se utilizaron a una concentración de 10 pM (Gravekamp, 1993). Se utilizó una solución mezcla de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP y dCTP), a una concentración de 10mM cada uno y Taq Polimerasa 5 U/µl.²⁶ Las condiciones de la prueba de PCR en el termociclador ²⁷ fueron: una fase inicial de desnaturalización de 94°C durante 5 minutos, después 40 ciclos de una fase de desnaturalización de 94°C durante 30 segundos, una fase de alineación de oligonucleótidos a 55°C durante 45 segundos y una fase de extensión a 72°C durante 50 segundos y por último un ciclo a 72°C durante 7 minutos. El ADN amplificado fue visualizado en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (1 µg/ml) y expuesto a luz ultravioleta en un transiluminador ²⁸ para observar y documentar el resultado fotográficamente.

²⁵ Jenway Mod. 6305 Staffordshire, UK

²⁶ Roche Switzerland.

²⁷ Pelkin Elmer, Mod. 2400 Massachusetts, USA.

²⁸ Fotodyne Hartland, WI, USA.

6.11 Inmunodetección tipo Western

Para determinar las proteínas de la membrana externa de *Leptospira* inductoras de inmunidad generada por los inmunógenos en los hámsteres, se realizó la prueba de inmunodetección tipo Western. Se utilizaron los sueros de los animales inoculados con títulos más altos en AM y ELISA de los 6 grupos (uno por grupo). Después de realizar la electroforesis de las proteínas en un gel desnaturante de poliacrilamida-SDS al 12% en una cámara para electroforesis vertical,²⁹ se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa P inmovilizada.³⁰ Primero, se sumergió la membrana cortada al tamaño del gel en metanol absoluto frío durante 15 segundos, luego durante 5 minutos en solución amortiguadora de Towbin (Apéndice I), el gel de poliacrilamida se mantuvo en agitación durante 15 minutos a 15 rpm en la misma solución, se ensambló el cartucho en un recipiente con solución amortiguadora de Towbin, todos los componentes fueron humedecidos en esta solución.

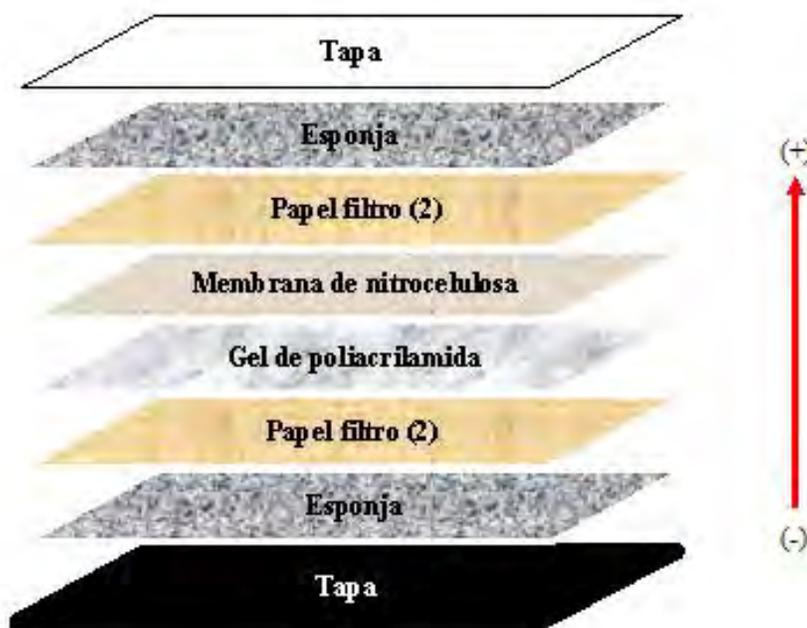


Figura 8. Representación esquemática de los componentes requeridos para la inmunoelectrotransferencia de proteínas de un gel de poliacrilamida SDS a una membrana de nitrocelulosa.

²⁹ BioRad

³⁰ Millipore

Después, se colocó la cámara de electroforesis dentro de un recipiente con refrigerantes y se llenó con amortiguador de transferencia frío (Apéndice I) (figura 9). Se transfirieron las proteínas del gel a la membrana a 100 volts durante 90 minutos, al término del tiempo, la membrana se lavó 3 veces con TBS (Apéndice I), durante 5 minutos, luego se bloqueó la membrana con TBS-T con 3 % de leche descremada (Apéndice I) durante 1 hora y después se incubó la membrana con los sueros diluidos 1/100 (anticuerpo primario), durante toda la noche (16 horas), a temperatura ambiente. Después, la membrana se lavó tres veces con TBS-T con 3 % de leche descremada y dos más con TBS durante 5 minutos, todos los lavados en agitación orbital a 15 rpm. Se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-IgG o anti-IgM de hámster sirio dorado, en una dilución de 1/5,000 durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó tres veces con TBS-T y una vez con TBS, después se colocó la membrana en solución de revelado (Apéndice I), durante 15 min en agitación hasta observar las bandas oscuras del complejo anticuerpo-proteína.

7. RESULTADOS

7.1 Aglutinación microscópica.

Los sueros fueron analizados por aglutinación microscópica, se utilizó como antígeno *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola Hond Utrecht IV (cepa de referencia).

Del grupo 1 inmunizado con la vacuna con extractos de membrana externa de la cepa LOCaS46 virulenta, hubo 5 animales con un título de 1:10 en los primeros 3 muestreos; en el cuarto muestreo después del desafío, sólo se pudo tomar muestra de 3 animales, encontrándose un título mayor de 1:1,280.

En el grupo 2 inoculado con la cepa LOCaS46 no virulenta, hubo 3 animales con títulos siendo el máximo título de 1:80 en los primeros tres muestreos, en el cuarto muestreo hubo 5 animales alcanzando el título mayor de 1:1,280 y se encontraron 3 animales con título menor a 1:10.

El grupo 3 inmunizado con la cepa de referencia Canicola Hond Utrecht IV en el primer y segundo muestreo fueron negativos todos los animales, en el tercer muestreo se encontraron 4 animales con títulos de 1:10 y 1:20 y en el cuarto muestreo hubo 7

animales con títulos de hasta 1:2,560, se encontraron dos animales con títulos menores a 1:10. (Cuadro 3)

Del grupo 4 inmunizado con EME de la cepa LOCaS46 virulenta con adyuvante, en los primeros tres muestreos se encontraron 12 animales con títulos, de hasta 1:40; en el cuarto muestreo se encontraron 5 animales con títulos de hasta 1:640 y tres sueros con títulos menores a 1:10. En el grupo testigo A (5) inoculado solamente con el adyuvante, en el primer muestreo se encontró un animal con título de 1:10 y todos los demás fueron menores a 1:10 hasta el cuarto muestreo. En el grupo testigo B (6) al cual se le inoculo SSF, sólo en el segundo muestreo se encontraron dos animales con títulos de 1:10, los demás fueron menores a 1:10 hasta el cuarto muestreo (Cuadro 4).

Cuadro 2. Resultados de la prueba de AM 1. De los grupos. 1 LOCaS46 virulenta, 2 LOCaS46 no virulenta y 3 Canicola Hond Utrecht. M=Muestreo, H=No. Hamster, NEG=Negativo (< 1:10), X= Sin muestra (animales muertos), # POS= Número de positivos.

GRUPO	1.LOCaS46 Virulenta				2.LOCaS46 No virulenta				3.Hond Utrecht IV			
ANIMAL	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
H1	NEG	NEG	NEG	1:320	1:10	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	1:640
H2	NEG	1:10	NEG	X	NEG	NEG	X	X	NEG	NEG	NEG	1:2560
H3	NEG	NEG	X	X	NEG	NEG	NEG	1:160	NEG	NEG	NEG	1:320
H4	NEG	NEG	NEG	1:1280	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
H5	NEG	NEG	1:10	X	NEG	NEG	NEG	1:1280	NEG	X	X	X
H6	NEG	1:10	NEG	X	NEG	NEG	NEG	1:40	NEG	NEG	1:10	1:160
H7	NEG	NEG	NEG	1:640	1:80	NEG	NEG	1:160	NEG	NEG	1:10	1:320
H8	1:10	NEG	NEG	X	1:20	NEG	NEG	X	NEG	NEG	NEG	NEG
H9	NEG	NEG	1:10	X	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	1:20	1:20
H10	NEG	NEG	NEG	X	NEG	1:10	NEG	1:640	NEG	NEG	1:10	1:320
# POS	1	2	2	3	3	1	0	4	0	0	4	7

Cuadro 3. Resultado de la prueba de AM 2. De los grupos 4 LOCaS46 virulenta/adyuvante, 5 adyuvante y 6 SSF. M=Muestreo, H=No. Hamster, NEG=Negativo (< 1:10), X=Sin muestra (animales muertos), # POS= Número de positivos.

GRUPO	4. LOCaS46 VIR/ADYUVANTE				5. ADYUVANTE				6. SSF			
ANIMAL	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
H1	NEG	1:10	1:40	1:40	1:10	NEG	NEG	X	NEG	NEG	NEG	X
H2	1:10	1:10	1:10	NEG	NEG	NEG	NEG	X	NEG	1:10	NEG	NEG
H3	NEG	NEG	NEG	X	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	X
H4	1:40	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	X	NEG	NEG	NEG	NEG
H5	NEG	1:10	NEG	1:640	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	X
H6	NEG	1:10	NEG	X	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	X
H7	1:10	NEG	1:20	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
H8	NEG	NEG	NEG	1:40	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	1:10	NEG	NEG
H9	NEG	NEG	1:10	1:320	NEG	NEG	NEG	X	NEG	NEG	NEG	NEG
H10	NEG	NEG	1:10	1:20	NEG	NEG	NEG	X	NEG	NEG	NEG	NEG
# POS	3	4	5	5	1	0	0	0	0	2	0	0

7.2 ELISA indirecta

Los resultados obtenidos a partir de los sueros utilizando la técnica de ELISA para IgG fueron los siguientes. Primero se obtuvo el punto de corte a partir de la lectura de los sueros del primer muestreo (sueros negativos a partir de animales no inmunizados), en este caso la media de la lectura fue de 0.156_{490 nm}, el rango se obtuvo sumando 2 desviaciones estándar a la media, quedando en 0.209, a partir de esta lectura se consideró positivo.

En el caso del grupo 1 inoculado con la vacuna con la cepa LOCaS46 virulenta en el primer muestreo (previo a la inmunización) todos los sueros se consideraron negativos, en el segundo muestreo (después de la primera inmunización) y en el tercer muestreo (después de la segunda inmunización) todos los sueros que se obtuvieron fueron negativos. En el cuarto muestreo no se obtuvo muestra de seis animales ya que murieron y no se pudo obtener sangre, de los cuatro animales que sí se obtuvo suero, tres tuvieron lectura positiva y uno fue negativo.

Del grupo 2 vacunado con la cepa LOCaS46 no virulenta, en los muestreos 1, 2 y 3 no se obtuvo ningún suero positivo. En el cuarto muestreo (después del desafío) hubo siete positivos, uno negativo y de dos no se obtuvo muestra de suero.

Del grupo 3 vacunado con la cepa de referencia Canicola Hond Utrecht en el primer muestreo todos fueron negativos. En el segundo muestreo hubo un positivo, ocho negativos y de un animal no se obtuvo muestra por que murió, en el tercer muestreo hubo un positivo, ocho negativos y de uno no hubo muestra. En el cuarto muestreo ocho fueron positivos, un negativo y de uno no se obtuvo muestra.

En el grupo 4 vacunado con la cepa LOCaS46 virulenta adicionada con adyuvante (Hidróxido de aluminio) en el primer muestreo hay dos sueros positivos y ocho negativos, del segundo muestreo hubo tres positivos y siete negativos, en el tercer muestreo todos fueron positivos, del cuarto muestreo hubo dos hámsteres de los cuales no se obtuvo muestra, los ocho restantes fueron positivos.

Del grupo 5 al cual sólo se le aplicó adyuvante, en el primer muestreo hubo dos hámsteres sin muestra, uno fue positivo y siete fueron negativos, en el segundo y

tercer muestreo todos fueron negativos, en el cuarto muestreo a cinco hámsteres no se les pudo tomar muestra, de los otros cinco tres fueron positivos y dos negativos.

Del grupo 6 inoculado sólo con SSF en el primer, segundo y tercer muestreos todos fueron negativos, en el cuarto muestreo de cinco hámsteres no se pudo obtener muestra y los otros cinco fueron negativos (Apéndice II).

De los resultados obtenidos para IgM la media de la lectura para los sueros del primer muestreo (animales no inmunizados, sueros negativos) fue de 0.182 más dos desviaciones estándar, el punto de corte fue de 0.271 a partir de este se consideró positivo.

En el grupo 1 vacunado con LOCaS46 virulenta, durante el primer muestreo hubo dos hámsteres sin muestra, uno positivo y siete sueros negativos, en el segundo muestreo hubo diez sueros negativos, en el tercer muestreo hubo uno positivo, nueve sueros negativos y de un hámster no se obtuvo muestra, del cuarto muestreo sólo hubo 4 sueros positivos, de los seis animales restantes no se obtuvo muestra.

Del grupo 2 vacunado con LOCaS46 no virulenta, en el primer muestreo hubo ocho sueros negativos y dos positivos, del segundo muestreo los diez sueros fueron negativos, en el tercer muestreo de un hámster no se obtuvo muestra, cinco fueron positivos y cuatro sueros fueron negativos, en el cuarto muestreo de dos hámsteres no se obtuvo muestra, los ocho sueros restantes fueron positivos.

En el grupo 3 vacunado con la cepa de referencia, del primer muestreo diez sueros fueron negativos, del segundo muestreo de un hámster no hubo muestra, uno fue positivo y ocho sueros fueron negativos, en el tercer muestreo de un hámster no hubo muestra, uno fue positivo y ocho negativos, en el cuarto muestreo no hubo muestra de un hámster, seis fueron positivos y tres fueron negativos.

Del grupo 4 vacunado con LOCaS46 virulenta con adyuvante, en el primer muestreo hubo uno positivo y nueve sueros negativos, en el segundo muestreo de un hámster no hubo muestra, tres fueron positivos y seis negativos, del tercer muestreo dos fueron positivos y nueve sueros fueron negativos, en el cuarto muestreo de dos hámsteres no hubo muestra, seis fueron positivos y dos sueros fueron negativos.

En el grupo 5 inoculado sólo con adyuvante, durante el primer muestreo no se obtuvo muestra de dos hámsteres, uno fue positivo y siete negativos, en el segundo muestreo tres sueros fueron positivos y siete fueron negativos, del tercer muestreo diez sueros fueron negativos, en el cuarto muestreo de cinco hámsteres no se obtuvo muestra, cuatro sueros fueron positivos y dos negativos.

En el grupo 6 inoculado sólo con SSF, del primer muestreo diez sueros fueron negativos, en el segundo muestreo tres sueros fueron positivos y siete negativos, del tercer muestreo un suero fue positivo y nueve negativos, del cuarto muestreo de cinco hámsteres no se obtuvo muestra, cuatro sueros fueron positivos y un suero fue negativo (Apéndice II).

Se utilizó la prueba de T-student para determinar diferencias significativas entre las medias de las lecturas obtenidas en la prueba de ELISA, en los diferentes muestreos de los grupos estudiados. Se utilizó el programa estadístico IBM SPSS Statistics 20™.

Se encontró que existe evidencia estadística significativa entre las medias de las lecturas del primer, segundo y tercer muestreo con respecto a la media de la lectura del cuarto muestreo con un nivel de significancia del 2 % ($P < 0.02$), tanto de los resultados de IgG como de los de IgM.

Cuadro 4. Promedio de las lecturas para IgG en la prueba de ELISA.

GRUPO	1ER M	2DO M	3ER M	4TO M
LOCaS46 VIR	0.15755	0.1564	0.09038889	0.487
LOCaS46 NO VIR	0.1405	0.12155	0.09844444	0.921125
CAN REF	0.12565	0.15977778	0.16	0.92577778
LOCaS46 VIR+ADY	0.20385	0.22635	0.632	1.368125
ADYUVANTE	0.157375	0.0927	0.09745	0.0227
SSF	0.15395	0.08605	0.0924	0.1219

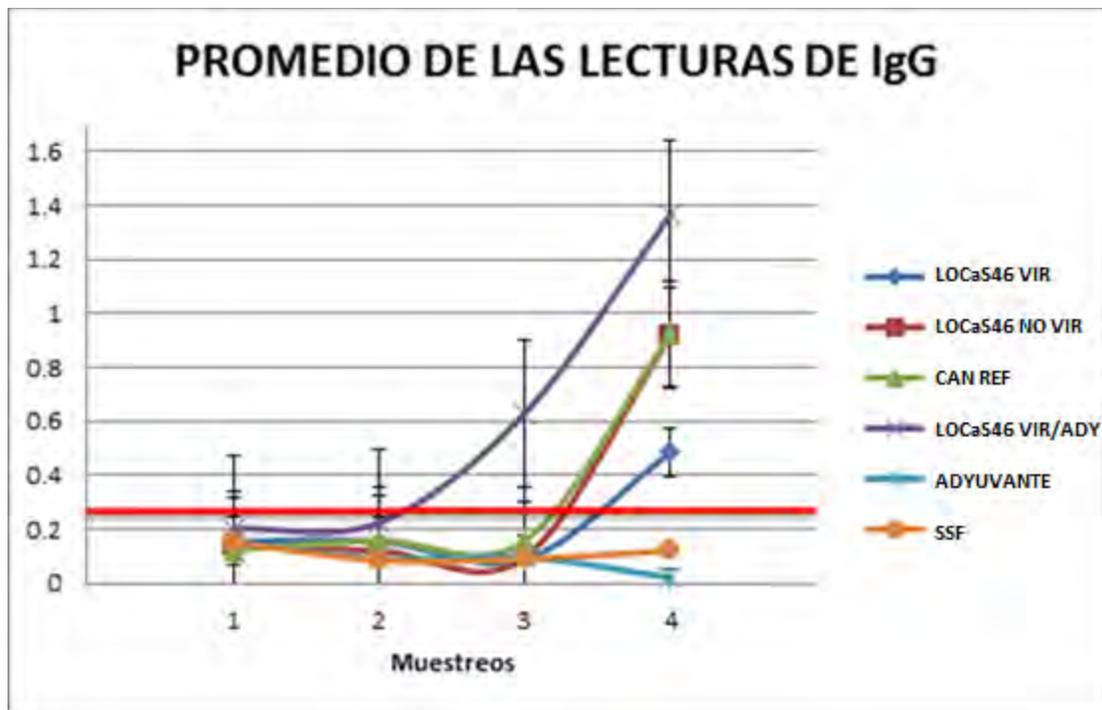


Figura 9. Medias de las lecturas (absorbancia 490 nm) para IgG, por grupo, durante los 4 muestreos, la línea en rojo indica el punto de corte (0.209), el desafío se realizó después del tercer muestreo.

Cuadro 5. Promedio de las lecturas para IgM en la prueba de ELISA.

GRUPO	1ER M	2DO M	3ER M	4TO M
LOCaS46 VIR	0.187625	0.16045	0.21938889	0.5740625
LOCaS46 NO VIR	0.1941	0.16115	0.28244444	0.517125
CAN REF	0.1755	0.23788889	0.18077778	0.379
LOCaS46 VIR+ADY	0.192	0.218	0.183	0.4295625
ADYUVANTE	0.17925	0.23935	0.13945	0.3168
SSF	0.1672	0.2464	0.1946	0.3037

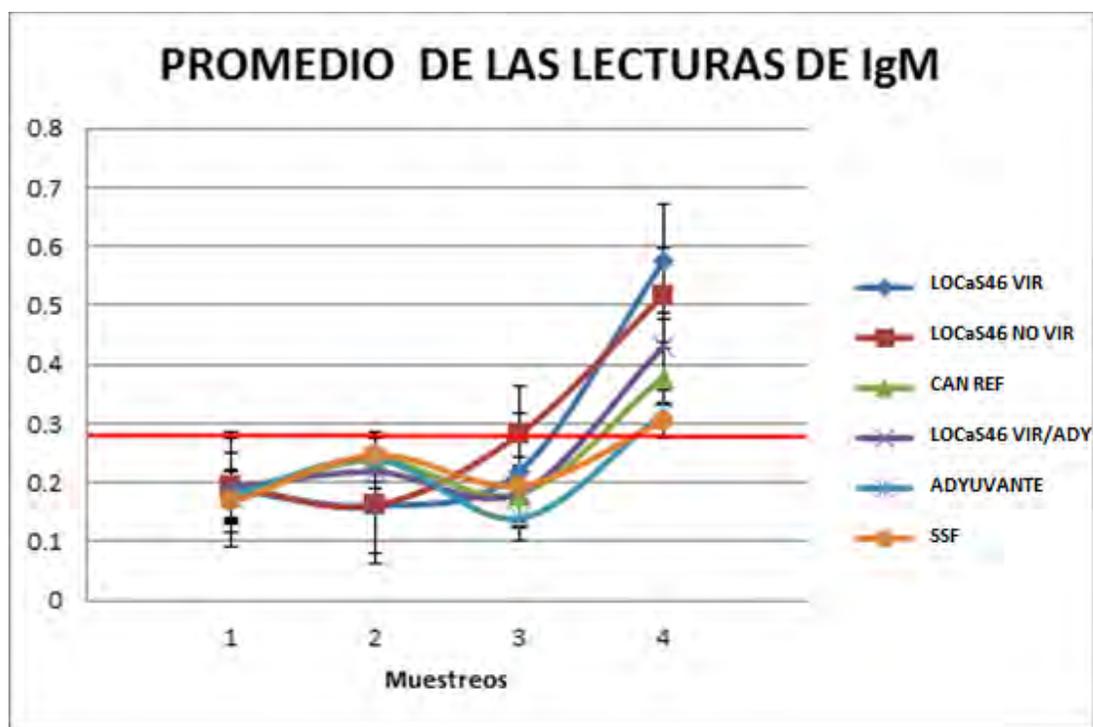


Figura 10. Medias de las lecturas (absorbancia 490 nm) para IgM, por grupo durante los 4 muestreos, la línea en rojo indica el punto de corte a 0.271, el desafío se realizó después del tercer muestreo.

7.3 Aislamiento y estado de portador.

De los grupos de animales inoculados con las diferentes vacunas y desafiados con 1,000 DL50 (5,000 leptospiras) de la cepa LOCaS46 virulenta, se obtuvieron los siguientes resultados: del grupo 1 vacunado con extractos de membrana externa LOCaS46 virulenta, de los 10 animales que inicialmente se trabajaron, 2 murieron durante el procedimiento de toma de muestra de sangre, por lo cual no se incluyeron en el estudio, de los 8 restantes, murieron 6 y sobrevivieron 2, dando un 25% de sobrevivencia, por lo cual esta vacuna se consideró no satisfactoria. De los animales que murieron se confirmó que fue por leptospirosis, ya que se presentó en ellos el cuadro característico de signos y lesiones, se aisló la bacteria de hígado y riñón y se detectó el ADN mediante la prueba de PCR; de los animales que sobrevivieron, no se recuperó a la bacteria ni se logró amplificar el ADN por PCR, por lo cual se dió un 100% de protección en esos dos animales.

En el caso del grupo 2 inmunizado con la vacuna preparada con extractos de membrana externa de la cepa LOCaS46 no virulenta, un hámster murió durante los muestreos, por lo cual el grupo quedó con 9 animales, de los cuales 7 sobrevivieron al desafío y dos murieron teniendo un 77.7% de sobrevivencia. Por no alcanzar el 80%, se consideró a esta vacuna no satisfactoria. En 4 de los animales que sobrevivieron se recuperó el microorganismo a partir de riñón y en 2 a partir de hígado; en uno de ellos se detectó ADN de la bacteria en riñón por PCR. En los tres hámsteres restantes sobrevivientes no se logró aislamiento ni se detectó ADN. Por lo cual el porcentaje de protección contra la infección en los sobrevivientes fue del 42.8%. En el caso de los que murieron por el desafío se aisló y se obtuvo ADN de la bacteria de ambos órganos, riñón e hígado (Cuadro 6 y figura 11).

Cuadro 6. Aislamiento y PCR de los grupos 1 y 2. S=Sacrificado, M=Muerto, H=No. Hamster y NO= Hámster muerto durante los muestreos. Con asteriscos se identifican a los animales de los que no se obtuvo aislado ni ADN de *Leptospira*.

1.LOCaS46 VIRULENTA						2.LOCaS46 NO VIRULENTA					
		CULTIVO		PCR				CULTIVO		PCR	
ANIMAL	MUERTE	HIG	RIÑ	HIG	RIÑ	ANIMAL	MUERTE	HIG	RIÑ	HIG	RIÑ
H1	S	-	-	-	-	*H1*	S	-	-	-	-
H2	NO					H2	NO				
H3	NO					H3	S	-	+	-	-
H4	M	+	+	+	+	*H4*	S	-	-	-	-
H5	M	+	+	+	+	H5	S	-	+	-	+
H6	M	+	+	+	+	*H6*	S	-	-	-	-
H7	S	-	-	-	-	H7	S	+	+	-	+
H8	M	+	+	+	+	H8	M	+	+	+	+
H9	M	-	+	+	+	H9	M	+	+	+	+
H10	M	+	+	+	+	H10	S	+	+	-	-
Sobrevivencia 25% (2 de 8)						Sobrevivencia 77.7% (7 de 9)					
Protección contra la infección en los sobrevivientes 100% (2 de 2)						Protección contra la infección en los sobrevivientes 42.8% (3 de 7)					

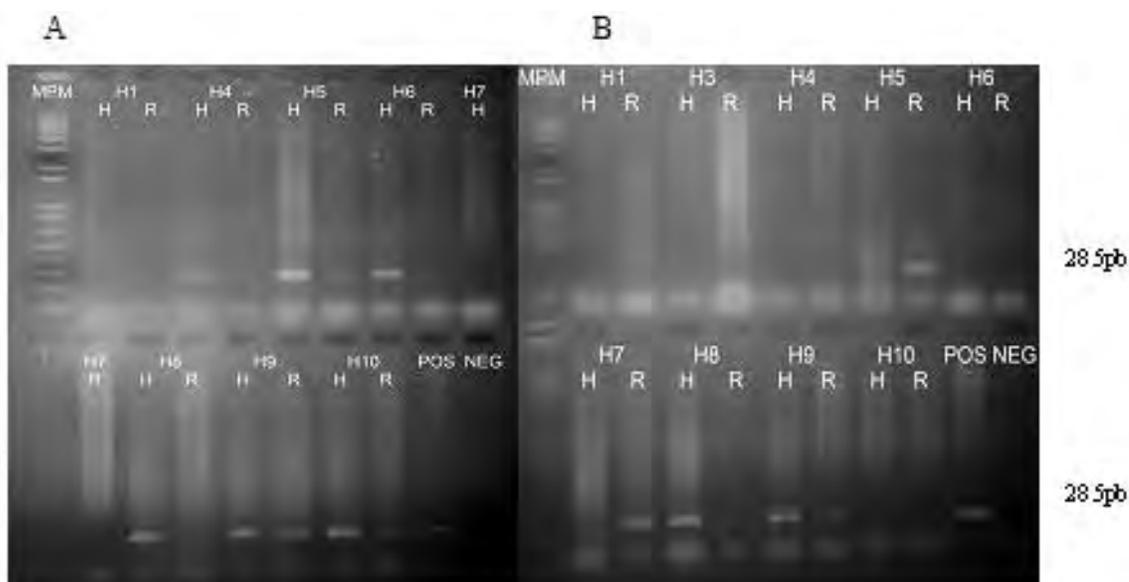


Figura 11. PCR 1. A Grupo 1 LOCaS46 virulenta. B .Grupo 2 LOCaS46 no virulenta. MPM=marcador de peso molecular 1Kb, H1=identificación hámster 1, H=hígado, R=riñón, POS=control positivo 285pb, NEG=control negativo.

Del grupo 3 inmunizado con extractos de membrana externa de la cepa Canicola Hond Utrecht IV, un animal se descartó ya que murió durante los muestreos, de los 9 restantes, 8 sobrevivieron y sólo 1 murió dando un 88.8% de sobrevivencia, considerándose satisfactoria. Del hámster que murió, se recuperó la bacteria en cultivo y se detectó ADN de la misma en hígado y riñón. De los que sobrevivieron, sólo de 3 se obtuvo la bacteria por aislamiento a partir de riñón, no se detectó ADN de ninguno de los animales por lo que el porcentaje de protección contra la infección en los sobrevivientes fue del 62.5%.

El grupo 4 inoculado con extractos de membrana externa de la cepa LOCaS46 virulenta adicionada con hidróxido de aluminio como adyuvante, se trabajaron 9 animales, ya que uno murió durante los muestreos; de esos, 7 sobrevivieron al desafío (77.7%), de los cuales sólo se aisló la bacteria en un animal a partir de riñón. De los dos que murieron, se recuperó la bacteria de hígado y riñón, se detectó ADN de hígado de uno de ellos y de riñón de los dos por PCR, de los otros 6 animales no se obtuvo ni aislado ni amplificado, por lo cual la protección contra la infección en los sobrevivientes fue del 85%. (Cuadro 7 y figura 12).

Cuadro 7. Aislamiento y PCR de los grupos 3 y 4. S=Sacrificado, M=Muerto, H=No. Hamster y NO=Hámster muerto durante los muestreos. Con asteriscos se identifican a los animales de los que no se obtuvo aislado ni ADN de *Leptospira*.

3. Hond Utrecht IV						4. LOCaS46 VIRULENTA/ADYUVANTE					
		CULTIVO		PCR				CULTIVO		PCR	
ANIMAL	MUERTE	HIG	RIÑ	HIG	RIÑ	ANIMAL	MUERTE	HIG	RIÑ	HIG	RIÑ
H1	S	-	+	-	-	*H1*	S	-	-	-	-
H2	S	-	+	-	-	*H2*	S	-	-	-	-
H3	S	-	+	-	-	H3	M	+	+	-	+
H4	S	-	-	-	-	H4	M	+	+	+	+
H5	NO					*H5*	S	-	-	-	-
H6	M	+	+	+	+	H6	NO				
H7	S	-	-	-	-	*H7*	S	-	-	-	-
H8	S	-	-	-	-	*H8*	S	-	-	-	-
H9	S	-	-	-	-	H9	S	-	+	-	-
H10	S	-	-	-	-	*H10*	S	-	-	-	-
SOBREVIVENCIA DE 88.8% (8 DE 9)						SOBREVIVENCIA DE 77.7% (7 DE 9)					
PROTECCIÓN CONTRA LA INFECCIÓN EN						PROTECCIÓN CONTRA LA INFECCIÓN EN					
LOS SOBREVIVIENTES 62.5%						LOS SOBREVIVIENTES 85%					
(5 DE 8)						(6 DE 7)					

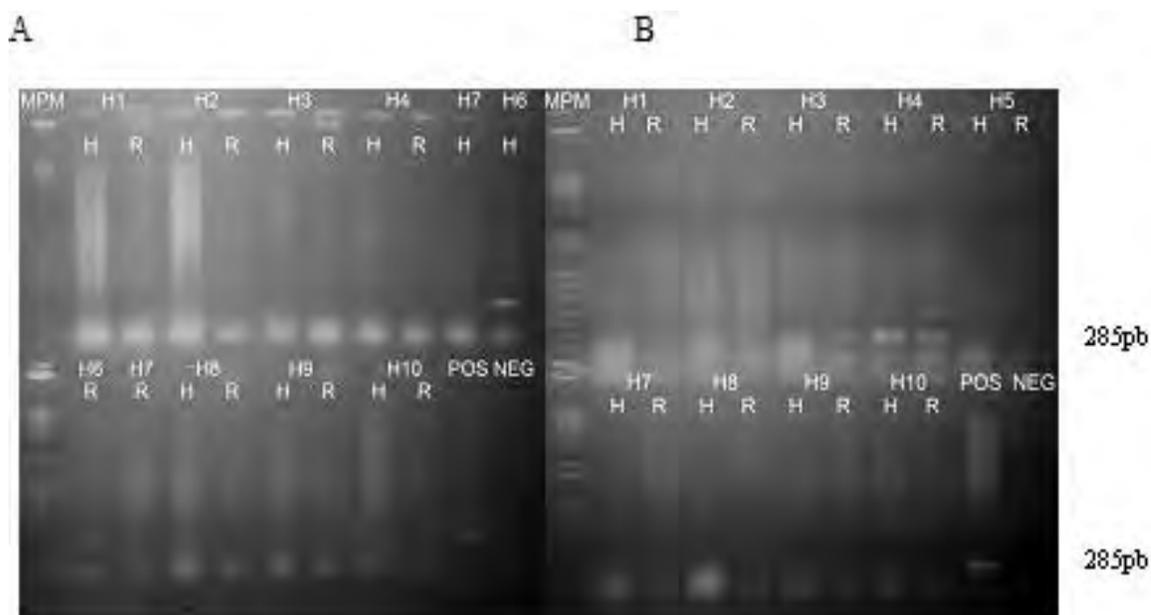


Figura 12. PCR 2. A Grupo 3 Canicola Hond Utrecht. B Grupo 4 LOCaS46 Virulenta con adyuvante. MPM=marcador de peso molecular 1Kb, H1=identificación hámster 1, H=hígado, R=riñón, POS=control positivo 285pb, NEG=control negativo.

Del grupo 5 (testigo A), inoculado sólo con adyuvante murieron 9 hamsteres (90%), de esos 9 hámsteres se obtuvo el aislamiento de la bacteria, de 5 se amplificó ADN de *Leptospira* a partir de hígado y riñón, un animal sobrevivió del cual no se pudo aislar ni detectar ADN.

En el caso del grupo 6 (testigo B) inoculado con SSF sólo se trabajo con 7 animales, ya que los otros 3 murieron durante el muestreo, de esos, 7 murieron (100%) después del desafío, obteniéndose el aislamiento en todos ellos y el amplificado de ADN de la bacteria a partir de hígado y riñón en 6 de ellos (Cuadro 8 y figura 13).

Cuadro 8. Aislamiento y PCR de los grupos 5 y 6. S=Sacrificado, M=Muerto, H=No. Hamster y NO= Hámster muerto durante los muestreos. Con asteriscos se identifican a los animales de los que no se obtuvo aislado ni ADN de *Leptospira*.

5.ADYUVANTE (TESTIGO A)						6. SSF (TESTIGO B)					
ANIMAL	MUERTE	CULTIVO		PCR		ANIMAL	MUERTE	CULTIVO		PCR	
		HIG	RIÑ	HIG	RIÑ			HIG	RIÑ	HIG	RIÑ
H1	M	+	+	-	-	H1	NO				
H2	M	+	+	-	-	H2	M	+	+	+	+
H3	M	+	+	+	+	H3	NO				
H4	M	+	+	+	+	H4	M	+	+	+	+
H5	S	-	-	-	-	H5	M	+	+	-	-
H6	M	+	+	+	+	H6	M	+	+	+	+
H7	M	+	+	+	+	H7	M	+	+	+	+
H8	M	+	+	+	+	H8	M	+	+	+	+
H9	M	+	+	-	-	H9	M	+	+	+	+
H10	M	+	+	-	-	H10	NO				
SOBREVIVENCIA DE 10% (1 DE 10)						SOBREVIVENCIA DE 0% (0 DE 7)					

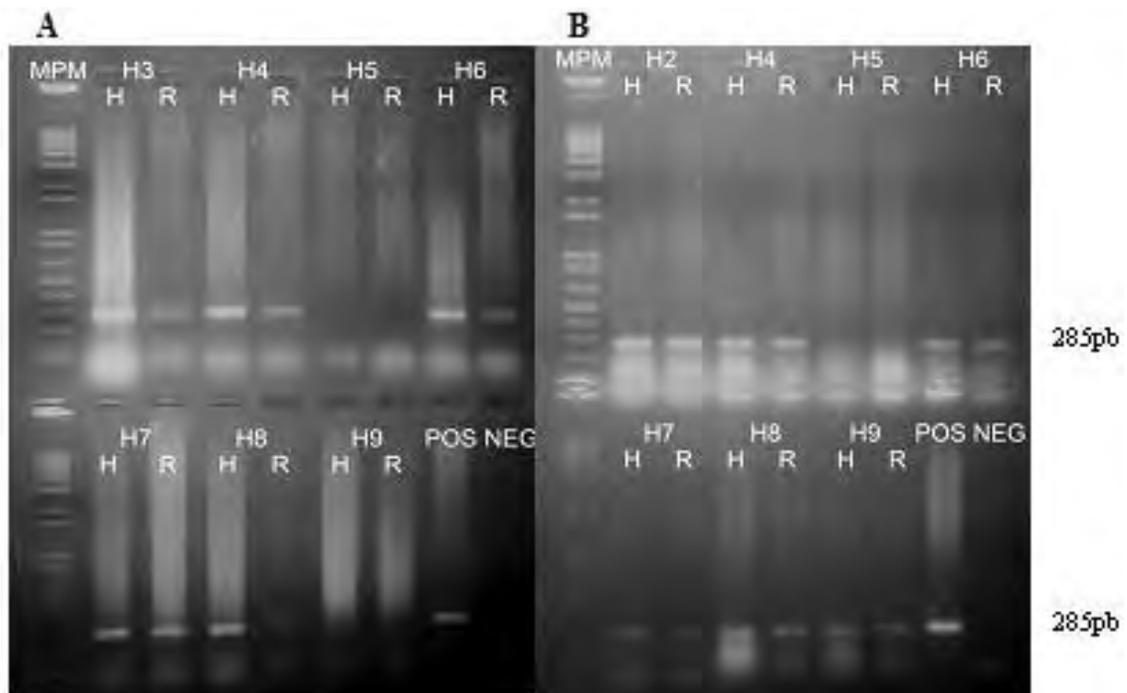


Figura 13. PCR 3. A Grupo 5 Adyuvante. B Grupo 6 SSF. MPM=marcador de peso molecular 1Kb, H3=identificación hámster 3, H=hígado, R=riñón, POS=control positivo 285pb, NEG=control negativo.

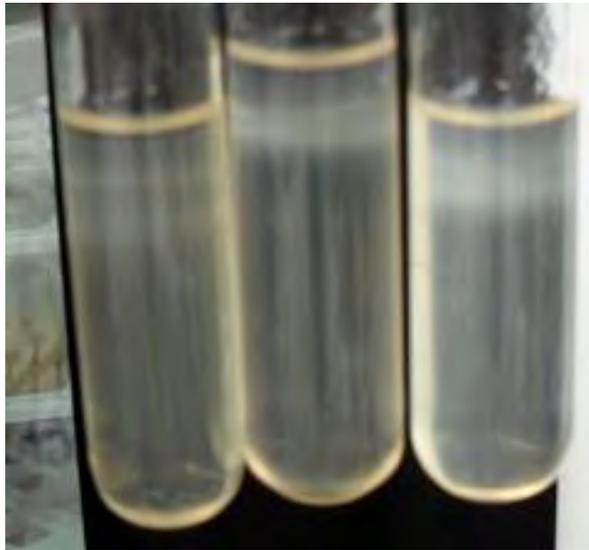


Figura 14. Cultivos de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LoCaS46 en medio semisolido Fletcher a los 15 días de incubación a 30 C, del hamster 4 del grupo 46R Virulenta, se aprecia la presencia del anillo de Dinger.

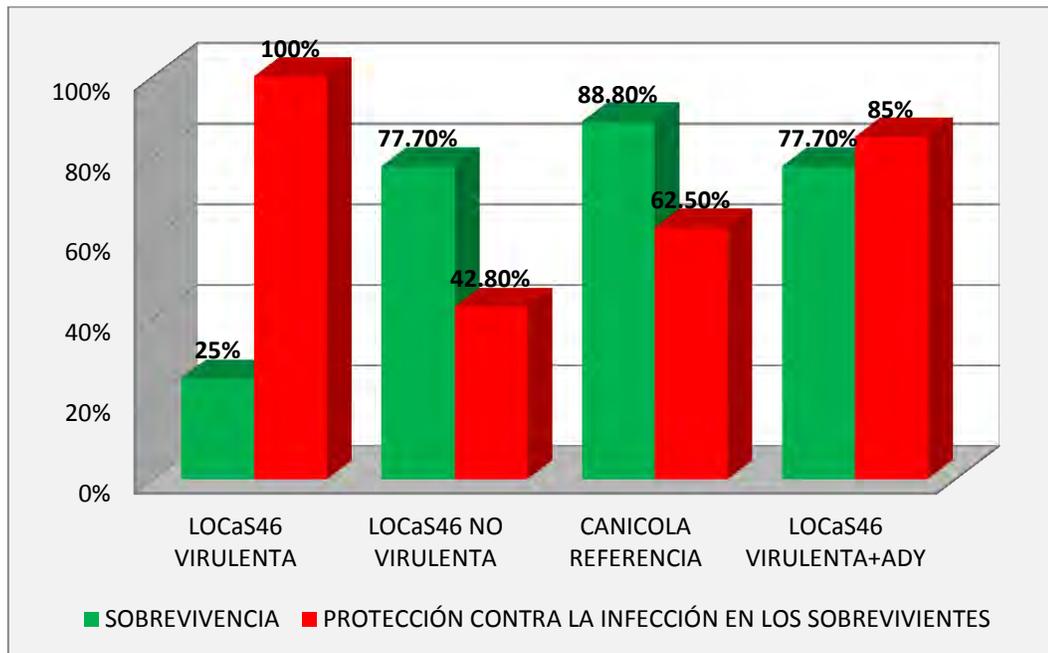


Figura 15. Comparación entre los grupos en cuanto al porcentaje de sobrevivencia y protección contra la infección de los inmunógenos.

Es importante mencionar que en los animales que murieron por la infección producida por el desafío, se encontraron zonas hemorrágicas en el parénquima pulmonar, en algunos de estos animales también se observó macroscópicamente la orina diluida y se observó hematuria en microscopio de campo oscuro, ambas condiciones son características de leptospirosis en hámsteres, esto se confirmó con PCR y cultivo (Figura 16).

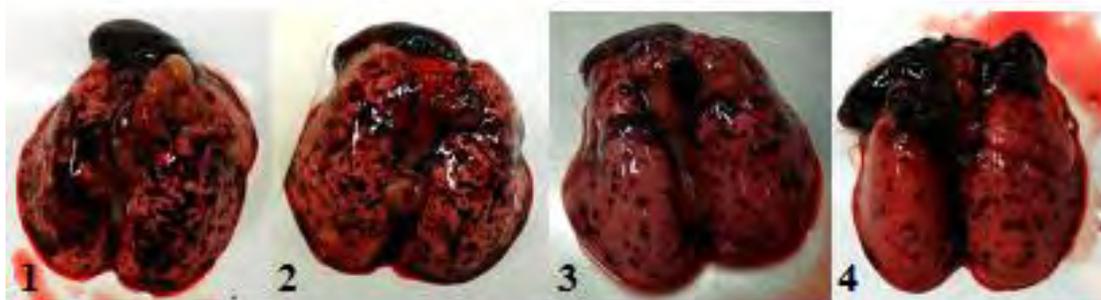


Figura 16. Pulmones de hámsteres con hemorragias de izquierda a derecha: 1. SSF (H4), 2. Adyuvante (H3), 3. SSF (H7) y 4. LOCaS46R virulenta+adyuvante (H3).

En los hámsteres que sobrevivieron y en los que no se aisló al microorganismo, ni se amplificó ADN, no se encontraron estas hemorragias en los pulmones y la orina se encontró concentrada, lo cual es una condición normal en la orina de los hámsteres sanos (Figura 17).



Figura 17. Pulmones de hámsteres que sobrevivieron al desafío, de izquierda a derecha: 1. LOCaS46 virulenta (H1), 2. LOCaS46+adyuvante (H5), 3. LOCaS46 virulenta (H7) y 4. Canicola referencia (H4).

7.4 Inmunodetección tipo Western

Se realizó una electroforesis de los extractos proteicos en un gel de poliacrilamida, para después hacer la transferencia en la membrana de nitrocelulosa (figura 18).

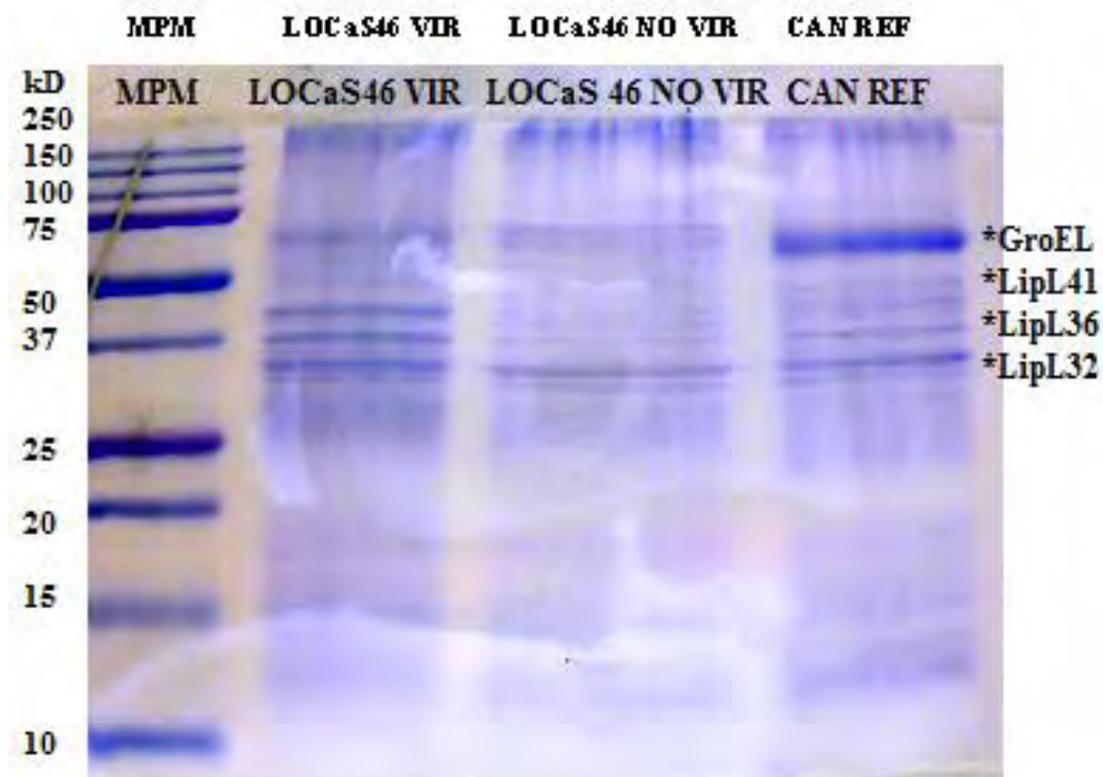


Figura 18. Diferentes extractos proteicos. Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie, se muestra la electroforesis de extractos proteicos de membranas externas de las tres cepas, por los pesos moleculares de las bandas se supone que corresponde a las proteínas mencionadas marcado con asterisco (*).

Para la detección de proteínas de membrana externa que inducen respuesta inmune por el método tipo Western se utilizaron los sueros con las lecturas positivas más altas en ELISA, de los diferentes grupos, después del desafío (Cuadro 9).

Cuadro 9. Sueros tomados en el cuarto muestreo después del desafío, utilizados para la inmunodetección tipo Western

GRUPO	ANIMAL	ELISA	AM	PCR	AI SL.	SOBREVIVIÓ
1. LOCaS46 VIR	H7	0.663	1:640	NEG	NEG	SI
2. LOCaS46 NO VIR	H10	1.598	1:640	NEG	POS	SI
3. CAN REF	H10	1.594	1:320	NEG	NEG	SI
4. LOCaS46 VIR/ADY	H8	1.825	1:40	NEG	NEG	SI
5. ADYUVANTE	H6	0.285	NEG	POS	POS	NO
6. SSF	H7	0.171	NEG	POS	POS	NO

Por los resultados obtenidos en la prueba de ELISA se determinó sólo detectar anticuerpos IgG, dado que para IgM las lecturas fueron bajas (Figura19 y 20).

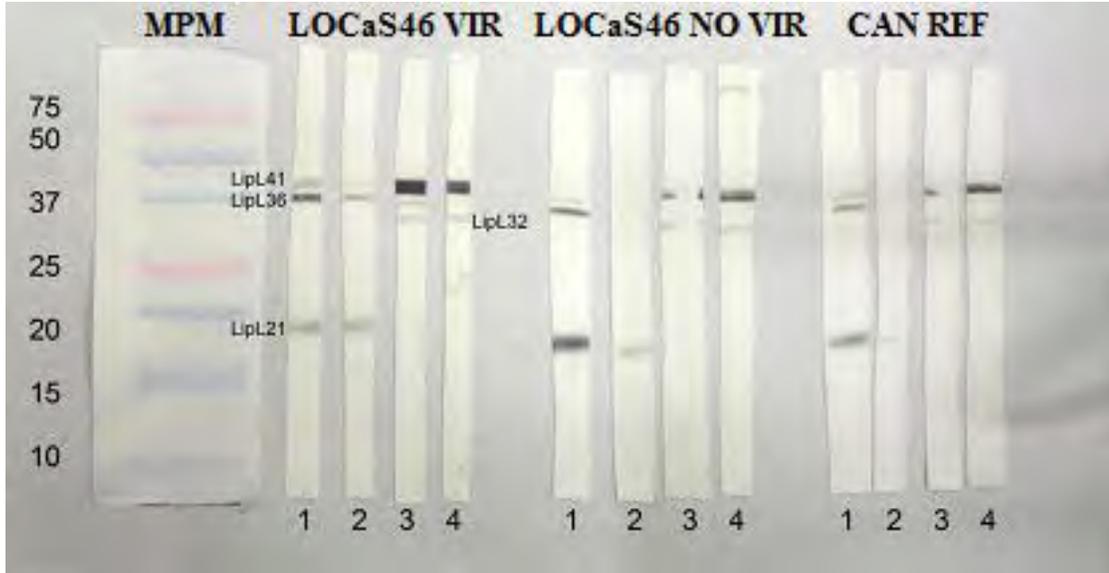


Figura 19. Inmunoelectrotransferencia 1. MPM: marcador de peso molecular. LOCaS46 VIR, LOCaS46 NO VIR, CAN REF: Diferentes extractos proteicos de las diferentes cepas. Sueros del cuarto muestreo. 1 suero grupo LOCaS46 virulenta (H7), 2 suero grupo LOCaS46 no virulenta (H10), 3 suero grupo Canicola referencia (H10) y 4 suero grupo LOCaS46 virulenta/adyuvante (H8), se marca a las bandas por su peso molecular como probables proteínas LipL21, LipL32, LipL36 y LipL41.

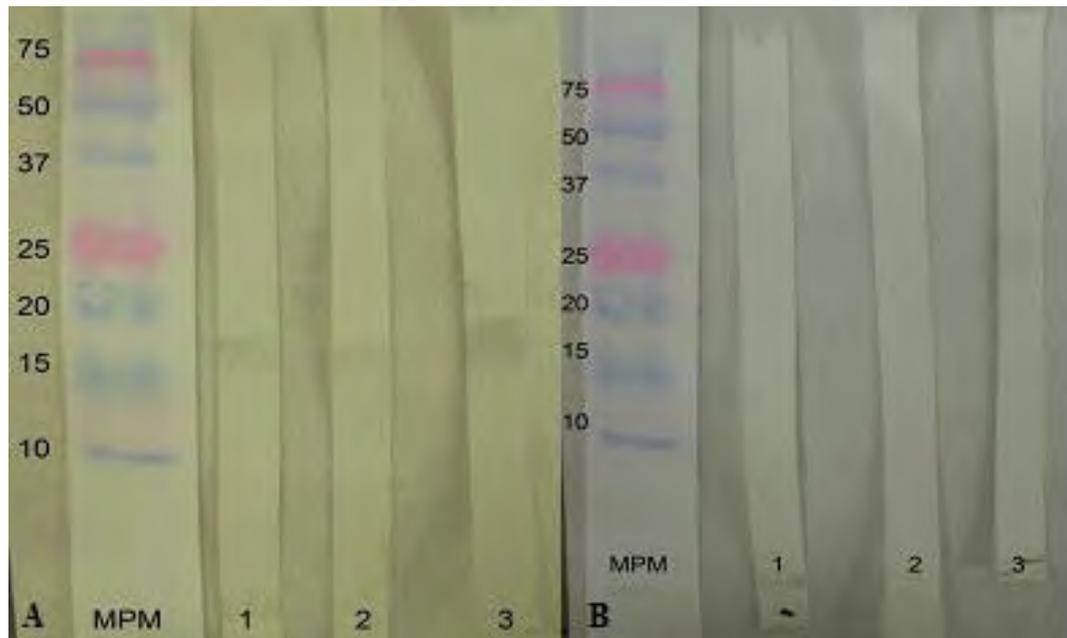


Figura 20. Inmunoelectrotransferencia 2. Sueros del cuarto muestreo A. Suero grupo 5 (H6) 46. B. Suero grupo 6 (H7) cuarto muestreo, 1 LOCaS46 virulenta, 2 LOCaS46 no virulenta y 3 Canicola referencia.

8.- DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se prepararon 4 diferentes inmunógenos a partir de extractos proteicos de membranas externas de *Leptospira*. El mejor contemplando las características, de sobrevivencia (77.7%) y de protección contra la infección en los sobrevivientes (85%), fue el hecho a partir de la cepa Canicola LOCaS46 virulenta adicionada con hidróxido de aluminio como adyuvante. En cuanto a la sobrevivencia de los animales vacunados y después desafiados con la cepa homologa virulenta LOCaS46, el mejor fue el preparado a partir de la cepa de referencia Canicola Hond Utrecht IV con un 88.8% (8/9), le siguieron los inmunógenos preparados a partir de las cepas LOCaS46 no virulenta y LOCaS46 virulenta adicionada con hidróxido de aluminio como adyuvante con un 77.7% (7/9) cada una, la vacuna de la cepa LOCaS46 virulenta tuvo sólo un 25% (2/8) de sobrevivencia. En cuanto a la capacidad protectora de los inmunógenos, contra la infección en los sobrevivientes, el de mayor protección fue el de la cepa LOCaS46 virulenta con un 100% (2/2), le siguió la vacuna de la cepa LOCaS46 virulenta adicionada con hidróxido de aluminio como adyuvante con un 85% (6/7), después la de la cepa de referencia Canicola Hond Utrecht IV con un 62.5% (5/8) y por último la de la cepa LOCaS46 no virulenta con un 42.8% (3/7)

Hace años se pensaba que la inmunidad protectora contra leptospirosis era dada por la producción de anticuerpos dirigidos al LPS, sin embargo demostraron que altos niveles de anticuerpos inducidos después de una inmunización con bacterinas convencionales no eran protectores para bovinos contra el desafío con *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Bolin y Alt, 2001). En ese mismo estudio, la inmunización en bovinos con una vacuna monovalente elaborada con *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo, generó protección contra la infección con la serovariedad homóloga, evitando la colonización del tejido renal y la eliminación por orina, generando una respuesta del tipo Th1. La respuesta dominante contra la infección con leptospirosis patógenas es la inmunidad humoral Th2, sin embargo la respuesta Th1 mediada por células pudiera también participar. Estudios recientes

muestran que leptospiras inactivadas previamente con calor inducen respuestas mediadas por células T-CD4 y T γ/δ , además de estimular la producción de citosinas tipo Th1 (respuesta inmune mediada por células), esto sugiere que este tipo de respuesta esta involucrada en el efecto protector contra la bacteria (Lin *et al.*, 2010).

En este estudio la utilización del hidróxido de aluminio, fue por un lado por la naturaleza del antígeno (extractos proteicos) y por otro lado por las ventajas del adyuvante, como la creación de un depósito del antígeno en los tejidos donde se inyectó, liberándolo en forma lenta y generando una exposición prolongada del mismo; facilitar la presentación del antígeno a las células presentadoras, la activación del complemento, la estimulación de los macrófagos para inducir la activación de los linfocitos (Hunter, 2002). Esto le dió a la vacuna la capacidad de producir una fuerte respuesta tipo Th2. Se ha demostrado que el hidróxido de aluminio a través de la interleucina 4 (IL-4) aumenta la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) tipo II en la superficie de monocitos en humanos, estimulando directamente a las células presentadoras de antígeno, el incremento en la síntesis de RNA mensajero para citosinas del tipo Th2 como IL-4 e IL-6, que participan en la diferenciación de células B a células secretoras de anticuerpos específicos contra antígeno, estos sucesos representan el mecanismo del efecto del hidróxido de aluminio (Ulanova *et al.*, 2001).

Esto explica el porque de la respuesta en cuanto a la protección (85%) y sobrevivencia (77.7%) de la vacuna adicionada con hidróxido de aluminio como adyuvante, además de la elevación al triple en la lectura de la detección de anticuerpos IgG en la prueba de ELISA en el tercer muestreo, en este grupo previo al desafío. Podemos decir que este incremento se debió a la presencia del adyuvante en la vacuna. Después del desafío, se detectó un incremento de la lectura del cuarto muestreo en los grupos vacunados incluso en el grupo inoculado sólo con SSF, a excepción del grupo inoculado con adyuvante en el cual no hubo incremento. En el caso de los anticuerpos IgM, se detectó un incremento del doble en la lectura en todos los grupos, sólo después del desafío, lo cual se explica por la presencia de la bacteria, ya que la respuesta esta dada principalmente por el LPS (Jost *et al.*, 1988). Esto se

confirma con los resultados de la aglutinación microscópica (AM), en los que se muestra un incremento en el título de anticuerpos en todos los grupos, solamente en el cuarto muestreo el cual fue después del desafío; cabe recordar que en el caso de esta prueba los principales anticuerpos detectados son los del tipo IgM.

La protección conferida por los inmunógenos se refiere al hecho de evitar la infección de la bacteria en los hámsteres, eliminando así el estado de portadores. En los animales que sobrevivieron al desafío, lo primero que se vio al realizar la necropsia es que no se encontraron lesiones, sobretodo en pulmón, ni se encontró la orina diluida condiciones características en los animales que sí murieron por la infección, lo cual se corroboró con la ausencia de desarrollo en los medios de cultivo a partir de las muestras de hígado y de riñón, así como de la no amplificación de productos de ADN de *Leptospira* con iniciadores específicos utilizados en la prueba de PCR.

El análisis de los sueros utilizados para la inmunodetección, mostró una reactividad hacia lo que se piensa son las lipoproteínas: LipL41, LipL36, LipL32 y LipL21 presentes en la membrana externa. LipL41 y LipL32 se sabe que están expuestas parcialmente en la superficie de *Leptospira*, al igual que LipL32, son reconocidas durante la respuesta inmune humoral hacia leptospirosis, expresadas durante la infección en humanos, mientras que LipL36 se expresa de menor forma por regulación negativa (Guerreiro *et al.*, 2001).

LipL21 se ha reportado como una de las proteínas más abundante en la membrana externa, en un estudio de expresión de antígenos durante la infección en hámsteres, primero se denominó p22, una vez analizada en geles de doble dimensión determinaron que era la misma, esto lo hicieron con la serovariedad Lai de *L. interrogans*. Es una proteína conservada, que puede estimular una inmunidad heteróloga (Cullen *et al.*, 2003).

En este mismo estudio, estas lipoproteínas son principalmente detectadas por anticuerpos IgG, pudiéndose ocupar para el diagnóstico serológico de pacientes con leptospirosis aguda, sospechosos, en fases convalecientes y para confirmar casos no detectados por pruebas básicas de laboratorio (Guerreiro *et al.*, 2001). En el caso de los grupos control, inoculados solo con adyuvante y SSF. No se detectaron anticuerpos

IgG, contra estas proteínas en la prueba de inmunodetección, lo cual se relaciona con las lecturas encontradas en la prueba de ELISA, donde no se encontraron positivos en el grupo de SSF, en el de adyuvante se encontraron solo tres sueros positivos en el último muestreo.

9.- CONCLUSIONES

- Se realizó la prueba de potencia en los inmunógenos, siendo la única satisfactoria de acuerdo a las normas en vacunas contra leptospiras la de la cepa Canicola Hond Utrecht IV con un 88.8% de sobrevivencia..
- Se evaluaron los inmunógenos producidos, encontrando que el mejor en cuanto la sobrevivencia y la protección contra la infección fue la que se hizo a partir de la cepa LOCaS46 virulenta adicionada con hidróxido de aluminio como adyuvante.
- En el caso de la prueba de ELISA, se observó que sólo en el caso del grupo inmunizado con la vacuna LOCaS46 virulenta adicionada con hidróxido de aluminio con adyuvante, se detectó un incremento de anticuerpos IgG en el tercer muestreo (antes del desafío) y 14 días después de la segunda inmunización. En el caso de los anticuerpos IgM, se detectó un aumento en los anticuerpos sólo después del desafío en todos los grupos.
- Se realizaron pruebas de inmunodetección tipo Western de 4 sueros de hámsteres inmunizados con las diferentes vacunas, de los cuales los sueros de los grupos inmunizados con la cepa LOCaS46+ adyuvante y con la cepa de referencia reaccionaron con lo que parece ser LipL41. Esto confirma que los inmunógenos aplicados a estos grupos de animales generaron una respuesta inmune hacia el microorganismo empleado después en el desafío.
- El suero del grupo inmunizado con la cepa LOCaS46 virulenta también reaccionó hacia LipL41, aunque en menor grado.
- De los dos grupos control, adyuvante y SSF, no tuvieron seroreacción hacia ninguna de las proteínas transferidas a las membranas.

- Se detectaron 4 bandas en las membranas de nitrocelulosa, que corresponden a los antígenos reconocidos por anticuerpos IgG presentes en muestras de sueros de los animales vacunados y que por sus pesos moleculares pudieran corresponder a LipL41, LipL 36, LipL32 y LipL21.
- Otras como GroEL (proteína de choque térmico) o la secretina GspD no fueron detectadas
- En los sueros de los grupos control (adyuvante y SSF) no se detectaron bandas por anticuerpos IgG hacia ninguna proteína.
- Se requiere continuar evaluando la capacidad inmunológica de esta vacuna realizando otro ensayo de inmunoprotección a mayor escala y en otra especie.
- El hecho de encontrar serorreacción contra las supuestas proteínas LipL41, LipL 36, LipL32 y LipL21 reconocidas como antígenos inmunológicos, nos plantea continuar evaluando estas proteínas para ver el potencial inmunogénico, contra otras serovariedades.

10. REFERENCIAS

- ABBAS AK. *Inmunología celular y molecular*. 6a ed. Elsevier, 2008.
- ADLER B, DE LA PEÑA-MOCTEZUMA A. *Leptospira and leptospirosis*. *Vet Microbiol* 2010;140:287-296.
- ADLER B, DE LA PEÑA-MOCTEZUMA A. *Leptospira*. In: Gyles CL, Prescott J, Songer J, Thoen C. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 385-396. Blackwell Publishing. Ames ,Iowa, USA,2004.
- ANDRÉ-FONTAINE G. Canine leptospirosis. Do we have a problem?. *Vet Microbiol* 2006; 117:19-24.
- ATZINGEN M.V., BARBOSA A.S., DE BRITO T., VASCONCELLOS S.A., DEMORAIS Z.M., LIMA .M, ABREU P.A., NASCIMENTO A.L. Lsa 21, a novel leptospiral protein binding adhesive atrix molecules present during human infection. *BMC Microbiol*. 2008; 29, 8-70.
- BARBOSA A.S, ABREU P.A., NEVES F.O., ATZINGEN M.V., WATANABE M.M., VIEIRA M.L., MORAIS Z.M., VASCONCELLOS S.A., NASCIMENTO A.L. A newly identified leptospira adhesin mediates attachment to laminin. *Infect. Immun*. 2006; 11, 6356-6364.
- BARBOSA A.S., ABREU P.A., VASCONCELLOS S.A., MORAIS Z.M., GONÇALES A.P., SILVA A.S., DAHA M.R., ISAAC L. Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human Complement regulator C4BP. *Infect. Immun*. 2009; 77:1137-1143.

- BARNETT JK, BARNETT D, BOLIN CA, SUMMERS TA, WAGAR EA, CHEVILLE NF, HARTSKEERL RA, HAAKE DA. Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. *Infect. Immun.* 1999. 67(2):853.
- BARNETT JK, BARNETT D, BOLIN CA, SUMMERS TA, WAGAR EA, CHEVILLE NF, HARTSKEERL RA, HAAKE DA. Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. *Infec Immun* 1999; (67) 2:853-861.
- BHARADWAJ R. Leptospirosis a reemerging disease?. *Indian J Med Res* 2004; 136-138.
- BLASI E., ARDIZZONI A., COLOMBARI B., NEGLIA R., BASCHIERI C., PEPPOLONI S., CINCO M. (2007). NFkB activation and p38 phosphorylation in microglial cells infected with *Leptospira* or exposed to partially purified leptospiral lipoproteins. *Microb. Pathog.* 2007; 42: 80-87.
- BLOOM A.M. Structural and functional studies of complement inhibitor C4b binding protein. *Biochem. Soc.Trans.* 2002; 30, 978-982.
- BOLIN CA, ALT DP. Use of monovalent leptospiral to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. *Am J Vet Res* 2001; 62:995-1000.
- BREINER D.D., FAHEY M., SALVADOR R., NOVAKOVA J., COBURN J. *Leptospira interrogans* binds to human Cell Surface Receptors including proteoglycans. *Infect. Immun.* 2009; 77, 5528-5536.

- BULACH DM, KALAMBAHETI T, DE LA PEÑA-MOCTEZUMA A, ADLER B. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Leptospira*. J Mol Microbiol Biotechnol. 2002; 2: 375-380.
- CASTILLO SLO. Detección de perros portadores de leptospiras patógenas: estudios bacteriológico, serológico y molecular (Tesis de Licenciatura) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2008.
- CASTILLO SLO, RAMÍREZ OJM, CARMONA GCA, DE LA PEÑA MA. Desarrollo de un modelo de infección experimental en hámsteres con una cepa virulenta de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria 2010 Campeche, México.
- CASTILLO SLO, ROA RMA, ORDOÑEZ BML, DE LA PEÑA MA. Detección de perros portadores de leptospiras patógenas. Universidad Nacional Autónoma de México. 2008
- CÉSPEDES M. Leptospirosis: Enfermedad zoonótica reemergente. Rev Peru Med Exp salud pública 2005; 22: 290-307.
- CÉSPEDES ZM, GLENNY AM, FELICES AV, BALDA JL, SUÁREZ MV. Prueba de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos IgM para el diagnóstico de leptospirosis humana. Rev Peru Med Exp salud pública 2002; 19 (1): 24-27.
- CHARON NW, GOLDSTEIN SF: Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. Annu Rev Genet 2002, 36:47-73.38,39],

- CHOY H.A., KELLEY M.M., CHEN T.L., MØLLER A.K., MATSUNAGA J., HAAKE D.A. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect. Immun.* 2007; 75, 2441-2450.
- CINCO M., CINI B., PERTICARARI S., PRESANI G. *Leptospira interrogans* binds the CR3 receptor on mammalian cells. *Microb. Pathog.* 2002; 33, 299-305.
- CINCO M., DOMENIS R., PERTICARARI S., PRESANI G., MARANGONI A., BLASI E. Interaction of *Leptospira* with murine microglial cells. *New Microbiologica* 2006; 29: 193-199.
- CRODA J., RAMOS J.G., MATSUNAGA J., QUEIROZ A., HOMMA A., RILEY L.W., HAAKE D.A., REIS M.G., KO A.I. *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis, *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45: 1528-1534.
- CULLEN PA, CORDELL SJ, BULACH DM, HAAKE DA, ADLER B. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect Immun* 2002; 70:2311-2318.
- CULLEN PA, HAAKE DA, BULACH DM, ZUERNER RL AND ADLER B. LipL21 Is a Novel Surface-Exposed Lipoprotein of Pathogenic *Leptospira* Species. *Infection and Immunity.* 2003, (71); 5:2414-2421.

- DAVIS BD, DUBOS JR. The binding of fatty acids by serum albumin, a protective growth factor in bacteriological media. JExp Med 1947;86: 215-228.
- 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.
- DELGADO F, BRIHUEGA B, VENZANO A, FUNES D, BLANCO VF. Adaptación de un protocolo de inmunohistoquímica para la detección de *Leptospira* spp, en muestras de tejido fijado en formaldehído. Rev Cubana Med Trop 2007; 59.
- ELLINGHAUSEN HC, PAINTER GM: Growth, survival, antigenic stability, and virulence of *Leptospira interrogans* serotype canicola. J Med Microbiol 1976, 9:29-37.
- ELLIS WA. Leptospirosis. J Small animal practice 1986; 27: 683-692.
- ESTAVOYER JM, RACADOT E, COUETDIC G, LEROY J, GROSPERRIN L. Tumor necrosis factor in patients with leptospirosis. Rev Infect Dis 1991; 13:1245-1246.
- FAINE S. *Leptospira* and Leptospirosis. 2nd ed. Melbourne: MediSci, 1999.
- FÉLIX SR, HARTWIG DD, ARGONDISSO AP, SILVA EF, SEIXAS FK, SEIXAS NETO AC, MEDEIROS MA, LILENBAUM W, DELLAGOSTIN

OA. Subunit approach to evaluation of the immune protective potential of leptospiral antigens. *Clin Vaccine Immunol* 2011; (18)12:2026-2030.

- GALLOWAY RL, LEVETT PN. Evaluation of Modified Pulse-Field Gel Electrophoresis Approach for the identification of *Leptospira* serovars. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78: 628-632.
- GIBSON DA SILVA F, CESAR D FREITAS J, KUROKI AE, YUMI HV, et al. Leptospire detection in kidney, liver and uterus of cows slaughtered in Paraná Brazil. *Braz J Microbiol* 2005; 36: 38-42.
- GIGLI I.T., FUJITA T., NUSSERZWEIG V. Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4 binding protein and C3b inactivator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979; 76: 6596-6600.
- GITTON X, DAUBIE MB, ANDRE F, GANIERE JP, ANDRE-FONTAINE G: Recognition of *Leptospira interrogans* antigens by vaccinated or infected dogs. *Vet Microbiol* 1994, 41:87-97.
- GOLDSTEIN SF, CHARON NW. Multiple exposure photographic analysis of a motile spirochete. *Proc Nat Acad Sci* 1990;87:4894-4899.
- GRAVEKAMP C, VAN DE KEMP H, FRANZEN M, CARRINGTON D, SHOONE GJ, VAN EYS GJJM, EVERARD COR, HARTSKEERL RA, TERPSTRA WJ. Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol* 1993; 139: 1691-1700.
- GUERREIRO H, CRODA J, FLANNERY B, MAZEL M, MATSUNAGA J, GALVAO REIS M, LEVETT PN, KO AI, HAAKE DA: Leptospiral proteins

recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. Infect Immun 2001, 69:4958-4968.

- HAAKE DA, CHAO G, ZUERNER RL, BARNETT JK, BARNETT D, MAZEL M, MATSUNAGA J, LEVETT PN, BOLIN CA: The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. Infect Immun 2000, 68:2276-2285.
- HAAKE DA, MATSUNAGA J. characterization of leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. Infect Immun 2002; 70:4936-4945.
- HAAKE DA, MAZEL MK, MCCOY AM, MILWARD F, CHAO G, MATSUNAGA J, WAGAR EA: Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. Infect Immun 1999, 67:6572-6582.
- HEATH SE, JOHNSON R. Leptospirosis. JAVMA 1994; 205:1518-1523.
- HOKE D.E., EGAN S., CULLEN P.A., ADLER B. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira spp.* and *Pseudoalteromonas tunicata*. Infect. Immun. 2008; 76: 2063-2069.
- HUNTER RL. Overview of vaccine adjuvants: present and future. Vaccine 2002; 20: S7-S12.
- ISOGAI E, ISOGAI H, FUJII N, OGUMA K. Macrophage activation by leptospiral lipopolysaccharide. Zentralblatt fur Bacteriologie 1990b; 273:200-208.

- JOHNSON CR, GAY ND. Nutrition of *Leptospira Pomona* III. Calcium, magnesium and potassium requirements. J Bacteriol 1963;1963: 983-985.
- JOHNSON RC, GARY ND. Nutrition of *Leptospira Pomona*. II. Fatty acid requirements. J Bacteriol 1963; 85: 976-982.
- JOST BH, ADLER B, FAINE S. Immunization with leptospiral lipopolysaccharide and polysaccharide. Australian Microbiologist 1988; 9: 414.
- JOST BH, ADLER B, FAINE S: Experimental immunisation of hamsters with lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans*. J Med Microbiol 1989, 29:115-120. 45.
- JOST BH, ADLER B, VINH T,FAINE S. A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. J Med Microbiol. 1986; 22:269-275.
- KLIMPEL G.R., MATTHIAS M.A., VINETZ J.M. *Leptospira interrogans* activation of human peripheral blood mononuclear cells: Preferential expansion of TCRgamma delta + cells vs TCR alpha beta+ T cells. J. Immunol. 2003; 171: 1447-1455.
- KO AL, GALVAO RM, RIBEIRO DCM, JOHNSON WD, RILEY LW. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. Lancet 1999; 354:820-825.

- KO AL, GOARAT C, PICARDEAU M. *Leptospira* : the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 736-747.
- KOISUMI N, WATANABE H. Molecular cloning and characterization of a novel leptospiral lipoprotein with OmpA domain. *FEMS Microbiol Letters*. 2003; 226: 215 – 219.
- KOIZUMI N., WATANABE H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. *Vaccine*. 2004; 22:1545-1552.
- LEE S.H., KIM K.A., PARK Y.G., SEONG I.W., KIM M.J., LEE Y.J. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar lai. *GENE*. 2000; 254: 19-28.
- LEE S.H., KIM K.A., PARK Y.G., SEONG I.W., KIM M.J., LEE Y.J. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar lai. *GENE*. 2000; 254, 19-28.
- LEMARROY VD, CARRILLO VM. Leptospirosis y disfunción orgánica multiple. Caso clínico y revisión de literatura. *Revista de la Asociación Mexicana de Medicina Crítica y Terapia Intensiva* 2003; 17:176-183.
- LEVETT PN, MOREY RE, GALLOWAY RL Steigerwalt AG. *Leptospira broomii* sp. Nov., isolated from humans with leptospirosis. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006; 56: 671-673.
- LEVETT PN. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; 14(2): 296-326.

- LI C, MOTALEB A, SAL M, GOLDSTEIN SF, CHARON NW: Spirochete periplasmic flagella and motility. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2000, 2:345-354. 39.
- LIN X, ZHAO J, QUIAN J, MAO Y, PAN J, LI L, PENG H, LUO Y, YAN J. Identification of Immunodominant B- and T-Cell Combined Epitopes in Outer Membrane Lipoproteins LipL32 and LipL21 of *Leptospira interrogans*. *Clinical Vaccine Immunology*. 2010; (17), 5:778-783.
- LIN Y., CHANG Y.F. A domain of the *Leptospira* LigB contributes to high affinity binding of fibronectin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 362: 443-440.
- LITTLE TWA. Changes in our understanding of the epidemiology of leptospirosis. In : Ellis WA, Little TWA, eds. *The present state of leptospirosis diagnosis and control*. Amsterdam: Martinus Nijhoff Publishers, 1986:149-74.
- MATSUNAGA J, YOUNG TA, BARNETT JK, BARNETT D, BOLIN CA, HAAKE DA: Novel 45-kilodalton leptospiral protein that is processed to a 31-kilodalton growth-phase-regulated peripheral membrane protein. *Infect Immun* 2002, 70:323-334.
- MATSUNAGA J., LO M., BULACH D.M., ZUERNER R.L., ADLER B., HAAKE D.A. Response of *leptospira interrogans* to physiologic osmolarity: relevance in signaling the environment-to host transition. *Infect. Immun*. 2007; 75: 2864-2874.

- MERI T., MURGIA R., STEFANEL P., MERI S., CINCO M. Regulation of complement activation at the C3 level by serum resistant leptospires. *Microb Pathog.* 2002; 39, 139-147.
- MERIEN F, TRUCCOLO J, BARANTON G, PEROLAT P. identification of 36.kDa fibronectin binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 185:17-22.
- MERIEN F, TRUCCOLO J, ROUGIER Y, BARANTON G, PEROLAT P. In vivo apoptosis of hepatocytes in guinea pigs infected with *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. *FEMS Microbiol Lett.* 1998; 169, 95-102.
- 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.
- MYERS D. Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de leptospirosis. Nota Técnica No. 30, Buenos Aires: Centro Panamericano de Zoonosis. OPS, 1985.
- NALLY J.E., WHITELEGGE J.P., BASSILIAN S., BLANCO D.R. LOVETT M. Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. *Infect. Immun.* 2007; 75: 766-773.

- NASCIMENTO ALTO, ALMEIDA VS, VAN SLUYS MA, MONTEIRO-VITORELLO B, CAMARGO LEA, DIGIAMPIETRI LA, HARSTKEERL RA, HO PL, MARQUES MV, OLIVEIRA MC, SETUBAL JC, HAAKE DA, MARTINS EA. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Braz Jour Med Biol Res* 2004; 37: 459-478.
- NERVIG RM, ELLINGHAUSEN HC JR, CARDELLA MA: Growth, virulence, and immunogenicity of *Leptospira interrogans* serotype szwajizak. *Am J Vet Res* 1977, 38:1421-1424.
- NIETO H. Epidemiología de la leptospirosis. Boletín de temas de salud de la Asociación de Médicos Municipales de la Ciudad de Buenos Aires. Suplemento del Diario del Mundo Hospitalario;2001.
- NOGUCHI H. The Spirochetes. The Newer Knowledge of Bacteriology and Immunology. Chicago: University of Chicago Press; 1928.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008. Paris, OIE, 2008. Capítulo. 2.1.9. Leptospirosis.
- ONO, K., AND J. HAN. 2000. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*. 12:1–13.
- PALANIAPPAN RU, MCDONOUGH SP, DIVERS TJ, CHEN CS, PAN MJ, MATSUMOTO M, CHANG YF: Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. *Infect Immun* 2006, 74:1745-1750.

- PATARAKUL K., LO M., ADLER B. Global transcriptomic response of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni upon exposure to serum. *BMC Microbiology*. 2010; 10, 31-38.
- PICARDEAU M, BRENOT A, SAINT GIRONS I. First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L.biflexa* *flaB* results in non-motile mutants deficient in endoflagella. *Mol Microbiol* 2001; 40: 189-199.
- PICARDEAU M, BULACH DM, BOUCHIER C, ZUERNER RL, ZIDANE N, WILSON PJ, *et al.* Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights in to the evolution of *Leptospira* and pathogenesis of leptospirosis. *PLoS ONE* 2008; 3:1607e.
- PINNE M., HAAKE D.A. A comprehensive approach to identification of surface-exposed, Outer Membrane-spanning proteins of *Leptospira interrogans*. *Plos One*, 2009; 4: e6071.
- QUE-GEWIRTH N.L., RIBEIRO A.A., KALB S.R., COTTER R.J., BULACH D.M., ADLER B., GIRONS I.S., WERTS C., RAETZ C.R. A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in *Leptospira interrogans* lipid A. The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. *J.Biol. Chem.* 2004; 279: 25420-25429.
- RAMÍREZ ORTEGA JM, CASTILLO SÁNCHEZ LO, DE LA PEÑA-MOCTEZUMA A. Desarrollo y estandarización de la prueba de ELISA indirecta para la detección de inmunoglobulinas IgG específicos en hámsteres

infectados con *Leptospira interrogans* serovar Canicola. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria 2010 Campeche, México.

- RISTOW P, BOURHY P, MCBRIDE FWDC, FIGUEIRA CP, HUERRE M, AVE P, SAINT GIRONS I, KO AI, PICARDEAU M. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. PLoS Pathog 2007; 3(7): e97. doi:10.1371/journal.ppat.0030097.
- RISTOW P., BOURHY P., KERNEIS S., SCHMITT C., PREVOST M.C., LILENBAUM W., PICARDEAU M. Biofilm formation by pathogenic and saprophytic *Leptospira*. Microbiology. 2009; 154, 1309-1317.
- RODRIGUEZ REA. Antigenicidad de la proteína de membrana externa GspD_L, la supuesta secretina del T2SS de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjobovis) (Tesis de Doctorado) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2007
- ROSSETI CA, VANASCO BN, CARTAGNINI JC. Comparison of tree diagnostic techniques for detection of leptospires in the kidneys of wild house mice (*Mus musculus*). Pesq Vet Bras 2004; 24: 6-10.
- RUIZ PH, PUC FM, FLORES AJ, VADO SI, CARDENAS MM. Isolation of *Salmonella enterica* and serologic reactivity to *Leptospira interrogans* in Opossums (*Didelphis virginiana*) from Yucatán, México. Rev Inst Med Trop S Paulo 2002; 44:235-237.
- SAMBRI V, MARANGONI A, GIACANI L, GENNARO R, MURGIA R, CEVENINI R, CINCO M. (2002). Comparative in vitro activity of five

cathelicidin-derived synthetic peptides against *Leptospira*, *Borrelia* and *Treponema pallidum*. *J. Antimicrob Chemother.* 50, 895-902.

- SAMBRI V, MARANGONI A, GIACANI L, GENNARO R, MURGIA R, CEVENINI R, CINCO M. Comparative in vitro activity of five cathelicidin-derived synthetic peptides against *Leptospira*, *Borrelia* and *Treponema pallidum*. *J. Antimicrob Chemother.* 2002; 50: 895-902.
- SCOCCHI D, ROMEO D, CINCO M. Antimicrobial activity of two bactericins against Spirochetes: *L. interrogans*, *L. biflexa* and *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 1993; 61: 3081-3083.
- SCOCCHI D, ROMEO D, CINCO M. (1993). Antimicrobial activity of two bactericins against Spirochetes: *L. interrogans*, *L. biflexa* and *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 61, 3081-3083.
- SEGERS RP, VAN GESTEL JA, VAN EYS GJ, VAN DER ZEIJST BA, GAASTRA W. presence of putative sphingomyelinase genes among members of the family *Leptospiraceae*. *Infect Immun* 1992; 60:1707-1710.
- SETUBAL JC, REIS MG, MATSUNAGA J, HAAKE DA. Lipoprotein computational prediction in spirochaetal genomes. *Microbiology* 2006; 152:113-121.
- SHANG ES, EXNER MM, SUMMERS TA, MARTINICH C, CHAMPION CI, HANCOCK RE, HAAKE DA. The rare outer membrane protein OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. *Infect Immun* 1995; 63:3174-3181.

- SHENBERG E. Growth of pathogenic *Leptospira* in chemically defined media. *J Bacteriol* 1966; 93: 1598-1606.
- SHIMIZU T, MATSUSAKA E, TAKAYANAGI K, MASUZAWA T, IWAMOTO Y, MORITA T, MIFUCHI I, YANAGIHARA Y: Biological activities of lipopolysaccharide- like substance (LLS) extracted from *Leptospira interrogans* serovar canicola strain Moulton. *Microbiol Immunol* 1987, 31:727-735.
- SILVA EF, MEDEIROS MA, MCBRIDE AJ, MATSUNAGA J, ESTEVES GS, RAMOS JG, SANTOS CS, CRODA J, HOMMA A, DELLAGOSTIN OA, HAAKE DA, REIS MG, KO AI: The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. *Vaccine* 2007, 25:6277-6286.
- 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. *Australian Vet J* 1994, 71; 290-294.
- SRIVASTAVA SK. Prospects of developing leptospiral vaccines for animals. *Indian J Med Microbiol* 2006; 24:331-6.
- STALHEIM OHV, WILSON JB. Cultivation of leptospirae I. Nutrition of *Leptospira canicola*. *J Bacteriol* 1964;88:48-54.
- STEVENSON B, CHOY HA, PINNE M, ROTONDI ML, MILLER MC, DEMOLL E, KRAICZY P, COOLEY AE, CREAMER TP, SUCHARD MA, BRISSETTE CA, VERMA A, HAAKE DA. *Leptospira interrogans*

endostatin-like outer membrane protein bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. PLoS One 2007; 14: 1188.

- TAIJIKI H, SALOMAO R. association of plasma levels of tumor necrosis factor alpha with severity of disease and mortality among patients with leptospirosis. Clin Infect Dis 1996; 23:1177-1178.
- TANGKANAKUL W, THARMAPORNPIL P, PLIKAYTIS BD, BRAGG S, POONSUKSOMBAT D, CHOOMKASEIN P. et al. Risk factors associated with leptospirosis in northeastern Thailand. 1988. Am J Trop Med Hyg 2000;63: 204-208.
- THIERMANN AB. Leptospirosis: current developments and trends. JAVMA 1984.184, 722-725
- THOMAS DD, HIGHBLE LM. In vitro association of Leptospire with host cells. Infect. Immun. 1990; 58: 581-585.
- TRUCCOLO J, SERAIS O, MERIEN F, PEROLAT P. Following the course of human leptospirosis: evidence of a critical threshold for the vital prognosis using a quantitative PCR assay. FEMS Microbiol. Lett. 2001; 204, 317-321.
- TRUEBA G. Biología de Leptospira. Memorias del Simposio internacional sobre Leptospira y leptospirosis en las Américas, México 2004. Memorias.
- ULANOVA M, TARKOWSKI A, HAHN-ZORIC M AND HANSON LA. The Common Vaccine Adjuvant Aluminum Hydroxide Up-Regulates Accessory Properties of Human Monocytes via an Interleukin-4-Dependent Mechanism. Infection and Immunity.2001. (69), 2:1151-1159.

- VERMA A, BRISSETTE CA, BOWMAN AA, SHAH ST, ZIPFEL PF, STEVENSON B. Leptospiral endostatin-like protein Len A is a bacterial cell-surface receptor for human plasminogen. *Infect.Immun.* in press.2010.
- VERMA A, HELLWAGE J, ARTIUSHIN S, ZIPFEL PF, KRAICZY P, TIMONEY JF, STEVENSON B. LfhA, a novel Factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. *Infect. Immun.* 2006; 74, 2659-2666.
- VERNEL-PAUILLAC F, MERIEN F. Proinflammatory and Immunomodulatory cytokine mRNA time course profile in hamsters infected with a virulent variant of *Leptospira interrogans*. *Infect. Immun.* 2006; 74: 4172-4179.
- VINETZ JM. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2001; 14:527-538.
- VINH T, ADLER B, FAINE S. Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide extracted from *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*. *J Gen Microbiol* 1986; 132:103-109.
- VINH T, SHI MH, ADLER B, FAINE S. Characterization and taxonomic significance of lipopolysaccharides of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *J Gen Microbiol.* 1989; 135:2663-2673.
- VINH TU, SHI MH, ADLER B, FAINE S: Characterization and taxonomic significance of lipopolysaccharides of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *J Gen Microbiol* 1989, 135:2663-2673.
- WAITKINS S, HOOKEY JV. Leptospirosis as an occupational disease. *Br J Ind Med* 1986; 20:721-725.

- WANG Z, WANG LJ and WEGRZYN A. Leptospirosis vaccines, *Microbial Cell Factories* 2007, (6) p. 39.
- WERTS C, TAPPING RI, MATHISON JC, CHUANG TH, KRAVCHENKO V, SAINT GIRONS, HAAHE DA, GODOWSKI PJ, HAYASHI F, OZINSKY A, UNDERHILL DM, KIRSCHNING C, WAGNER H, ADEREM A, TOBIAS PS, ULEVITCH RJ. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nature Immunol* 2001;2:346-352.
- WERTS C, TAPPING RI, MATHISON JC, CHUANG TH, KRAVCHENKO V, SAINT GIRONS, HAAKE DA, GODOWSKI PJ, HAYASHI F, OZINSKY A, UNDERHILL DM, KIRSCHNING C, WAGNER H, ADEREM A, TOBIAS PS, ULEVITCH RJ. Leptospiral lipopolysaccharide activates cell through a TLR2-dependent mechanism. *Nature Immunol* 2001; 2:346-352.
- WHO. Leptospirosis worldwide. *Weekly Epidemiological Record* 1999; 74: 237-242.
- WHO. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003; World Health Organization.
- WOLFF JW, BROM 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.

- YANAGIHARA Y, KAMISANGO K, TAKEDA K, MIFUCHI I, AZUMA I. identification of 4-o-methylmannose in cell wall polysaccharide of *Leptospira*. *Microbial Immunol* 1983; 27:711-715.
- ZUERNER R, HAAKE D, ADLER B, SEGERS R: Technological advances in the molecular biology of *Leptospira*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2000, 2:455-462. 47.

11. APÉNDICE I. Medios de cultivo y reactivos

Medios de cultivo para *Leptospira*

EMJH. (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) Medio de cultivo líquido (1 litro)

En 800 ml de agua destilada estéril se agregan y disuelven los siguientes ingredientes:

- Fosfato de sodio (Na_2HPO_4) 1.0 g
- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) 0.3 g
- Cloruro de sodio (NaCl) 1.0 g
- Piruvato de sodio ($\text{CH}_3\text{COCOONa}$) 0.2 g
- Acetato de sodio (CH_3COONa) 0.1 g
- Albumina sérica bovina fracción V 10 g

Ya disueltos se agregan las siguientes soluciones, todas se preparan primero en 10 ml de agua destilada estéril:

- Cloruro de amonio (2.5 g/10 ml) 1 ml
- Piruvato de sodio (1.0 g/9 ml) 1 ml
- Glicerol al 10 % (1 ml/10 ml) 1 ml
- Cloruro de calcio (CaCl_2) (0.15 g/10 ml) 0.7 ml
- Sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4/7\text{H}_2\text{O}$) (0.04 g/10 ml) 1 ml
- Sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4/4\text{H}_2\text{O}$) (0.01 g/10 ml) 1 ml
- Tiamina HCl (0.05 g/10 ml) 1 ml
- Cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2/2\text{H}_2\text{O}$) (0.15 g/10 ml) 0.7 ml
- Glicerol al 20 % (2 ml/8 ml) 0.5 ml
- Cianocobalamina (vitamina B12) (0.02 g/10 ml) 0.2 ml
- Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4/5\text{H}_2\text{O}$) (0.03 g/10 ml) 0.1 ml

En los 200 ml restantes se disuelve:

- Tween 80 1.25 ml
- Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4/7\text{H}_2\text{O}$) 0.01 g

Ya disuelto completamente se agrega a lo demás, se deja homogenizar todo el medio durante 2 horas, se mide el pH, el cual debe ser de 7.4, se filtra de forma estéril y se envasa.

Fletcher. Medio de cultivo semisólido (1 litro)

En 920ml de agua destilada se agrega lo siguiente:

- Extracto de carne 0.2 g
- Bacto peptona 0.3 g
- Cloruro de sodio (NaCl) 0.5 g
- Agar agar 1.8 g

Ya disuelto se calienta en el mechero hasta alcanzar la ebullición y después se esteriliza.

Se agregan 80 ml de suero de conejo estéril (filtrado por 0.22 μm), se homogeniza y se envasa.

Solución amortiguadora de fosfatos (SAF)

Primero se preparan por separado las siguientes soluciones:

1. Solución de Sorensen

- Fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4) 8.33 g
- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) 1.09 g

Se disuelven en 1000 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 7.6 y se esteriliza en autoclave.

2. Solución salina fisiológica

- Cloruro de sodio (NaCl) 8.5 g

Se disuelven en 1000 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza en autoclave.

3. Se mezclan 80 ml de solución de Sorensen con 920 ml de SSF, se ajusta el pH a 7.2

Soluciones para la prueba de ELISA

Solución de lavado

Tween 20 al 0.05%	500 µl
PBS	999.5 ml

Solución de bloqueo

Leche descremada al 3 %	3 g
PBS	300 ml

Solución para diluir sueros

Solución de lavado	300 ml
Leche descremada	3 g

Soluciones para extracción de proteínas de membrana externa

2x TNE-PI

- 20 mM Tris/HCl pH 8.0
- 300 mM NaCl
- 4 mM EDTA
- 0.5% (v/v) Inhibidor de Proteasas

Tritón X-114 al 10% (100 ml)

- Tritón X-114 grado proteína 10 ml
- Agua destilada estéril 90 ml

1M CaCl₂ (1 litro)

- CaCl₂ peso molecular en gramos 147.02 g
- Agua destilada estéril 1litro

SAF 5mM MgCl (1 litro)

Primero se prepara la SAF en 800 ml se disuelve:

- Cloruro de sodio (NaCl) 8 g
- Cloruro de potasio (KCl) 0.2 g
- Fosfato disódico anhidro (Na₂HPO₄) 1.44 g
- Fosfato monopotásico (KH₂PO₄) 0.24 g

Se ajusta el volumen a 1000 ml y el pH a 7.4, se esteriliza en autoclave.

MgCl 5mM

Se prepara a una concentración mayor (50mM), se pesan 1.0165 g de MgCl, se disuelve en 100 ml de agua destilada estéril, queda a una concentración de 50mM, se esteriliza en autoclave, para usarse se diluye en la SAF para que quede a una concentración de 5mM.

Amortiguador final de muestra

62.5 mM Tris HCl pH 6.8

10 % glicerol

2 % SDS

PMSF fluoruro de fenil metil sulfonilo

Se prepara a 25 mM en 10 ml, se disuelve en isopropanol 0.043 g. se filtra con membranas de 0.45 μ m, se diluye 10 veces con amortiguador final de muestra. Quedando a 0.25 mM.

Preparación de geles y soluciones para el procedimiento de SDS-PAGE (LAEMMLI)

Acrilamida

Acrilamida 30 g

Bis Acrilamida 0.8 g

Aforar a 100 ml con agua destilada estéril, filtrar y almacenar a 4°C en frasco ámbar.

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

Tris Base 54.45 g

Agua destilada 150 ml

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

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

Tris base 6.0 g

Agua destilada 50 ml

Ajustar el pH a 6.8 con HCl.

Aforar a 100 ml y almacenar a 4°C

SDS al 10%

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

Persulfato de amonio al 10%

Disolver 25 mg de Persulfato de amonio en 0.25 ml de agua bidestilada estéril.

Se envasa el producto en frascos con la menor cantidad ya que se caduca rápidamente.

Se prepara y utiliza al momento

Amortiguador de muestra

0.5 M Tris-HCl, pH6.8 1.0 ml

Glicerol 0.8 ml

SDS, 10% 1.6 ml

2-Mercaptoethanol 0.4 ml

0.5% azul de bromofenol en agua 0.4 ml

Agua destilada 3.8 ml

Diluir la muestra en proporción 1:1 con el amortiguador de muestra. Calentar a 100°C durante 5 minutos antes de colocar en el pozo del gel

Preferentemente almacenar a 4°C en un recipiente ámbar.

Amortiguador para electrodos 5X (Tanque)

Tris base 15.0 g

Glicina	72 g
SDS	5.0 g
Agua destilada cbp	1000 ml

Almacenar a 4°C. Calentar a 37°C si se precipita. Solución de trabajo: diluir 200 ml en 1 litro de agua para una corrida

Preparación del gel separador al 12%

Agua destilada	3.35 ml
30% Acrilamida	4.0 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 ml
SDS al 10%	100 µl
Persulfato de amonio al 10%	50 µl
TEMED	5 µl

Volumen total de monómero 10 ml

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

Preparación del gel concentrador al 4%

Agua destilada	3.05 ml
30% Acrilamida	0.67 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 ml
SDS al 10%	50 µl
Persulfato de amonio	
al 10%	25 µl
TEMED	5 µl

Volumen total de monómero 5.05 ml

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

Amortiguador para electro-elusión

Tris	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	1%

Tinciones y conservación de geles

Tinción de azul de Coomasie

Metanol Absoluto	500 ml
Ácido Acético	100 ml
Agua bidestilada	500 ml
Azul de Coomasie	0.55 g

Solución desteñidora para la tinción de azul de Coomasie

Metanol Absoluto	40%
Ácido Acético	10%
Agua	60%

Conservación de geles de poliacrilamida

Mojar papel celofán dulce con agua bidestilada y mojarse los dedos para facilitar el manejo del mismo y colocarlo sobre un cristal previamente humedecido con agua. A continuación se coloca el gel de poliacrilamida y se cubre con otro pedazo de papel

celofán dulce de tamaño mayor al del cristal. Se eliminan las burbujas, se colocan unas reletas de acrílico en los cuatro lados y se sujetan con pinzas para mantenerlo estirado. Esperar 24 a 48 horas para que se seque por completo el gel.

Alternativamente si se cuenta con una secadora de geles, se coloca el gel sobre papel filtro Whatman, se le coloca una capa de papel celofán dulce y se mete a la secadora de geles por vacío a 50°C durante 45 minutos.

Soluciones para electroforesis en geles de agarosa

Solución de TAE (Tris / acetato / EDTA) 50X (pH ~ 8.5)

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

Solución TAE de trabajo

20 ml de la solución TAE 50X

aforar a 1 litro con agua destilada

Agarosa

Disolver la cantidad de agarosa requerida (varia de acuerdo a la concentración que se desee del gel) en amortiguador TAE, calentando la mezcla en horno de microondas (calentar hasta que comience a hervir y mezclar en tres ocasiones). La mezcla ya lista debe quedar transparente y sin restos de agarosa en el fondo del matraz.

Amortiguador de carga para electroforesis de ADN bacteriano

38% de Sucrosa	1.9 g
0.1% de Azul de Bromofenol	5 mg
67mM de EDTA	0.124 g
Agua bidestilada	5 ml

Amortiguador de carga con dos colorantes para geles de agarosa

Azul de Bromofenol	0.25%
Xyleno Cianol FF	0.25%
de glicerol en agua	30%

Soluciones para transferencia e inmunodetección tipo Western

Amortiguador de Towbin

Tris (25 mM)	3.023 g
Glicina (192 mM)	14.4 g
Metanol (20%)	200 ml
SDS	0.037%

pH a 8.3

H₂O destilada cbp 1000 ml.

Se coloca en un matraz 700 ml de agua bidestilada, el tris y la glicina. La mezcla se mantiene en agitación hasta que se disuelvan completamente las sales, se agrega el SDS, disminuyendo la velocidad de agitador magnético para evitar la formación de espuma. Se ajusta el pH con NaOH 10 N y se afora a 800 ml. El amortiguador se mantiene en refrigeración hasta su uso. Antes de comenzar a utilizar el amortiguador de Towbin, se agregan 200 ml de metanol frío.

Amortiguador salino de tris [*Tris Buffered saline (TBS)*]

100 mM Tris HCl, pH 7.5

0.9% NaCl

Almacenar a 4°C

Amortiguador salino de tris-Tween 20 (TBS-T)

100 mM Tris HCl, pH 7.5

0.9% NaCl

0.05% de Tween 20

Almacenar a 4°C

Solución de revelado para inmunodetección tipo Western

100 ml TBS pH 8.0

20 ml de Metanol helado (-20° C) al cual se le agregan 60 mg de 4-1-cloro naftol

60 µl de peróxido de hidrógeno al 30%

Los 100 ml de TBS se mantienen en refrigeración durante 30 min. El 4-1-cloro naftol se agrega al metanol que debe estar frío (-20 °C) y se mezclan perfectamente (esta mezcla debe hacerse al momento en que se realizará el revelado). La mezcla anterior y el peróxido de hidrógeno se agregan al mismo tiempo pero en diferente sitio cada uno, del recipiente que contiene el TBS y se mezcla rápidamente para que se homogenicen todos los componentes. A continuación se introducen las membranas que se van a revelar, se tapa el recipiente y se cubre con papel aluminio para que la reacción se lleve a cabo en la obscuridad.

12. APÉNDICE II. Datos ELISAS.

LECTURAS PARA IgG									
46R VIR	1ER M	2DO M	3ER M	4TO M	46R V+AD	1ER M	2DO M	3ER M	4TO M
H1	0.1585	0.189	0.0875	0.5405	H1	0.141	0.3035	1.9735	1.7635
H2	0.2535	0.1245	0.069		H2	0.145	0.152	0.341	0.901
H3	0.1585	0.172			H3	0.0955	0.1215	0.447	
H4	0.137	0.187	0.083	0.6275	H4	0.1255	0.336	0.582	0.85
H5	0.1365	0.154	0.107		H5	0.0945	0.1085	0.3205	1.6525
H6	0.1905	0.131	0.1345		H6	0.12	0.139	0.261	
H7	0.1095	0.097	0.0755	0.663	H7	0.2275	0.171	0.9085	1.428
H8	0.142	0.202	0.1045		H8	0.7865	0.6265	0.9645	1.8255
H9	0.1445	0.1615	0.0785		H9	0.1785	0.1485	0.3675	1.634
H10	0.145	0.146	0.074	0.117	H10	0.1245	0.157	0.1545	0.8905

46R AVIR	1ER M	2DO M	3ER M	4TO M	ADYUV	1ER M	2DO M	3ER M	4TO M
H1	0.1955	0.12	0.099	0.2095	H1	0.1605	0.1	0.093	
H2	0.1515	0.103			H2	0.129	0.101	0.134	
H3	0.1535	0.1205	0.0785	1.4155	H3	0.0935	0.0945	0.1075	0.229
H4	0.1965	0.163	0.108	0.569	H4	0.17	0.087	0.0815	
H5	0.134	0.115	0.066	1.5395	H5	0.3145	0.084	0.0805	0.1205
H6	0.1105	0.1375	0.101	0.697	H6	0.1205	0.093	0.081	0.285
H7	0.161	0.0995	0.0755	1.209	H7	0.13	0.0795	0.0705	0.3955
H8	0.103	0.107	0.108		H8	0.141	0.084	0.097	0.105
H9	0.107	0.105	0.1525	0.1315	H9		0.076	0.1295	
H10	0.0925	0.145	0.0975	1.598	H10		0.128	0.1	

CAN REF	1ER M	2DO M	3ER M	4TO M	SSF	1ER M	2DO M	3ER M	4TO M
H1	0.137	0.159	0.113	1.033	H1	0.1225	0.0945	0.088	
H2	0.1085	0.117	0.1435	1.2325	H2	0.1325	0.1025	0.083	0.1155
H3	0.124	0.138	0.1215	1.209	H3	0.182	0.092	0.0905	
H4	0.1325	0.1405	0.1005	0.92	H4	0.1335	0.0975	0.1045	0.0985
H5	0.1315				H5	0.1475	0.0785	0.1275	
H6	0.183	0.166	0.097	0.1375	H6	0.16	0.077	0.084	
H7	0.124	0.132	0.093	1.4555	H7	0.1485	0.073	0.077	0.1715
H8	0.121	0.1705	0.562	0.653	H8	0.1335	0.091	0.0645	0.1195
H9	0.104	0.2055	0.0985	0.0975	H9	0.1255	0.0765	0.086	0.1045
H10	0.091	0.2095	0.111	1.594	H10	0.254	0.078	0.119	

LECTURAS PARA IgM									
46RVIR	1ER M	2DO M	3ER M	4TO M	46RVIR ADY	1ER M	2DO M	3ER M	4TO M
H1	0.29	0.125	0.349	0.70575	H1	0.149		0.2135	0.382
H2		0.133	0.2685		H2	0.184	0.1655	0.142	0.222
H3	0.238	0.179			H3	0.138	0.204	0.129	
H4	0.209	0.226	0.203	0.596	H4	0.175	0.184	0.12	0.603
H5	0.148	0.155	0.1975		H5	0.122	0.2815	0.1015	0.634
H6	0.165	0.1535	0.2185		H6	0.158	0.3755	0.1655	
H7	0.156	0.1275	0.1575	0.65	H7	0.283	0.309	0.228	0.3745
H8	0.158	0.1345	0.1935		H8	0.256	0.162	0.2045	0.3715
H9		0.132	0.159		H9	0.25	0.132	0.2425	0.687
H10	0.137	0.239	0.228	0.3445	H10	0.205	0.1485	0.2835	0.1625

46RAVIR	1ER M	2DO M	3ER M	4TO M	ADY	1ER M	2DO M	3ER M	4TO M
H1	0.201	0.1785	0.368	0.306	H1	0.279	0.133	0.162	
H2	0.168	0.1205			H2	0.122	0.147	0.1205	
H3	0.313	0.1595	0.2835	0.7995	H3	0.155	0.1435	0.131	0.316
H4	0.277	0.199	0.347	0.3485	H4	0.116	0.168	0.151	
H5	0.204	0.158	0.4905	0.8815	H5	0.208	0.265	0.1505	0.2605
H6	0.143	0.134	0.298	0.4675	H6	0.182	0.316	0.112	0.4385
H7	0.202	0.1945	0.266	0.5215	H7	0.218	0.3735	0.095	0.4035
H8	0.139	0.164	0.142		H8	0.154	0.2285	0.1375	0.1655
H9	0.164	0.1425	0.182	0.292	H9		0.382	0.188	0.3168
H10	0.13	0.161	0.165	0.5205	H10		0.237	0.147	

CAN REF	1ER M	2DO M	3ER M	4TO M	SSF	1ER M	2DO M	3ER M	4TO M
H1	0.182	0.18	0.1315	0.5065	H1	0.216	0.1415	0.1705	
H2	0.164	0.1855	0.152	0.687	H2	0.176	0.1935	0.278	0.215
H3	0.146	0.5815	0.1475	0.518	H3	0.161	0.166	0.1795	
H4	0.149	0.2595	0.1805	0.2595	H4	0.182	0.169	0.1925	0.398
H5	0.196				H5	0.178	0.2145	0.233	
H6	0.249	0.2345	0.1525	0.285	H6	0.126	0.1695	0.2015	
H7	0.221	0.1675	0.2365	0.437	H7	0.115	0.248	0.211	0.2995
H8	0.167	0.1905	0.4025	0.146	H8	0.141	0.3915	0.1515	0.3165
H9	0.147	0.1785	0.1075	0.185	H9	0.216	0.434	0.1715	0.2895
H10	0.134	0.1635	0.1165	0.387	H10	0.161	0.3365	0.157	

13. LISTA DE CUADROS

<u>Cuadros</u>	<u>Página</u>
Cuadro 1. Grupos de hámsteres utilizados.	21
Cuadro 2. Resultados de la prueba de AM 1.....	33
Cuadro 3. Resultado de la prueba de AM 2.....	33
Cuadro 4. Promedio de las lecturas para IgG en la prueba de ELISA.....	37
Cuadro 5. Promedio de las lecturas para IgM en la prueba de ELISA.....	38
Cuadro 6. Aislamiento y PCR de los grupos 1 y 2.....	40
Cuadro 7. Aislamiento y PCR de los grupos 3 y 4.....	42
Cuadro 8. Aislamiento y PCR de los grupos 5 y 6.....	44
Cuadro 9. Sueros utilizados para la inmunodetección tipo Western.....	47

14. LISTA DE FIGURAS

<u>Figuras</u>	<u>Página</u>
Figura 1. A. <i>Leptospira</i> con sus tres movimientos característicos. B. Morfología de la bacteria foto con microscopio electrónico de barrido.....	5
Figura 2. Las proteínas y lipoproteínas en las membranas de <i>Leptospira</i>	14
Figura 3. Identificación basada en muescas en el borde de la oreja,.....	23
Figura 4. Esquema que indica los muestreos previos a las inmunizaciones y el desafío.....	23
Figura 5. Inmunización vía subcutánea y desafío vía intraperitoneal con la cepa LOCaS46 virulenta de <i>L. interrogans</i> serovariedad Canicola.....	23
Figura 6. Toma de muestras: de sangre para obtener suero, de órganos durante la necropsia y de orina para observación en campo oscuro.....	25
Figura 7. Placa de 96 pozos mostrando la forma de colocar las diluciones de los sueros para aglutinación microscópica.....	26
Figura 8. Representación esquemática de los componentes requeridos para la inmunoelectrotransferencia de proteínas de un gel de poliacrilamida SDS a una membrana de nitrocelulosa.....	30
Figura 9. Medias de las lecturas (absorbancia 490 nm) para IgG.....	37

Figura 10. Medias de las lecturas (absorbancia 490 nm) para IgM,	38
Figura 11. PCR 1.....	40
Figura 12. PCR 2.	42
Figura 13. PCR 3.....	44
Figura 14. Cultivos de <i>Leptospira interrogans</i>	45
Figura 15. Comparación entre los grupos en cuanto al porcentaje de sobrevivencia y protección contra la infección de los inmunógenos.....	45
Figura 16. Pulmones de hámsteres con hemorragias	46
Figura 17. Pulmones de hámsteres que sobrevivieron al desafío.....	46
Figura 18. Diferentes extractos proteicos de las diferentes cepas.....	47
Figura 19. Inmunoelctrotransferencia 1.....	48
Figura 20. Inmunoelctrotransferencia 2.....	48

15. LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN:	ácido desoxirribonucleico
AM:	aglutinación microscópica
ARN:	ácido ribonucleico
CO:	campo oscuro
DLH:	dosis letal en hámster
dNTPs:	desoxirribonucleótidos trifosfatados
ELISA:	ensayo inmuno-enzimático
EME:	extractos de membranas externas
EMJH:	Ellingausen y McCulloch modificado por Johnson y Harris
FA:	fase acuosa
FD:	fase detergente
FNTα:	factor de necrosis tumoral alfa
g:	gramos
IgG:	inmunoglobulina isotipo G
IgM:	inmunoglobulina isotipo M
IHA:	inmunohistoquímica
IL:	interleucina
IMF:	inmunofluorescencia
kDa:	kilodaltones
KDO:	ácido cetodeoxioctanoico
kg:	kilogramos

LPS:	lipopolisacarido
M:	molar
MAPK:	proteinasas activadas por mitogenos
mg:	miligramos
min:	minutos
ml:	mililitro
µl:	microlitros
mM:	milimolar
NF-Kb:	factor nuclear kappa beta
OMS:	organización mundial de la salud
pb:	pares de bases
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
pM:	picomoles
PME:	proteínas de membrana externa
RPM:	revoluciones por minuto
SAF:	solución amortiguadora de fosfatos
SNC:	sistema nervioso central
SSF:	solución salina fisiológica
TBS:	solución amortiguadora de Towbin
TLR:	receptor tipo toll
U:	unidades
xg:	gravedades