



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

Inmunogenicidad de la proteína recombinante GspD de *Leptospira*  
*interrogans*

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

**MVZ. SAMANTHA PAULINA LLANOS SALINAS**

TUTOR PRINCIPAL:

**ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA UNAM

COMITÉ TUTORAL:

**ALFREDO SAHAGÚN RUIZ**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA (UNAM)

**JUAN JOEL MOSQUEDA GUALITO**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERETARO (UAQ)



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 mi padre Miguel Llanos Álvarez y mi hermano Jonathan Llanos Salinas, gracias por todo, por ayudarme, alentarme y apoyarme en cada una de las decisiones que he tomado, por permanecer a mi lado en todo momento y ayudarme a ser mejor persona, espero jamás decepcionarlos.

A mi ángel de 4 patas Espuma (Chikis) gracias por todo, aunque ya no estás conmigo, siempre estarás en mi corazón.

A mi madre Claudia Salinas Ruiz †, aunque físicamente ya no estás conmigo, siempre te siento a mi lado, y te recuerdo en todo momento, gracias a ti y a papá, he llegado hasta donde estoy, jamás voy a olvidar todos los momentos vividos, siempre me apoyaste, me alentaste a seguir adelante, incluso cuando estaba a punto de renunciar, confiaste en todo momento en mí, y me ayudaste a ver todo lo que puedo lograr.

*El hombre sabio para serlo  
recorrió primero la oscuridad;  
porque la oscuridad es el camino a la luz,  
y la luz el camino a la sabiduría  
Dios creó la luz en la oscuridad;  
todo viaje a la luz parte de las sombras.*

*Speculum aeternum (fragmento)  
Siglo IX*

## Agradecimientos

Al proyecto PAPIIT IN222193-3 “Inmunígenos recombinantes para la prevención de la leptospirosis y estudio de la respuesta inmune”, Laboratorio Adler pharma, Diagnóstico Veterinario Alhambra, y a Investigación, insumos y servicios agropecuarios, por brindar el apoyo económico para poder realizar este proyecto.

Al comité académico integrado por el doctor Juan Joel Mosqueda Gualito y el doctor Alfredo Sahagún Ruiz, y los miembros del jurado integrado por la doctora Gabriela Barcenas Morales, Laura Cobos Marin, Ingeborg Dorothea Becker Fauser, por las aportaciones y consejos que me brindaron durante la elaboración del proyecto.

Al centro de enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA), por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto, en especial a los académicos y administrativos que laboran dentro de la Unidad de Servicios de Diagnóstico y Constatación (USEDICO), principalmente a la doctora Carolina Segundo, por permitirme y facilitarme el uso de las instalaciones, gracias por estar siempre pendiente de nosotros, por sus consejos y enseñanzas.

A la doctora Irma Eugenia Candanosa Aranda, por apoyarme en la revisión de las laminillas de mis animales.

Al Grupo de Investigación en Leptospira y Leptospirosis (GrILLEP), Integrado María de Mar Cruz, Vanesa Jara, Efraín Trejo, Érica Loaiza y Ana Villegas.

Vanesa Jara, le agradezco a la vida el que nos hayamos cruzado, fuiste, eres y serás una gran amiga, estuviste conmigo en un momento muy difícil, y a pesar de la distancia me apoyaste y me escuchaste, ese gesto jamás lo voy a olvidar, te quiero mucho y siempre contarás conmigo.

A mis amigos, Eduardo Galindo (ya son muchos años que estamos juntos), Agustín Cortes, Francisco Gudiño, Miguel Galarde, gracias por estar conmigo, ayudarme, apoyarme y aguantarme.

Mi especial agradecimiento al doctor Alejandro de la Peña Moctezuma y a mi compañero y amigo Nery López González, juntos iniciamos esto, y pese a los pronósticos y “baches” que nos encontramos en el camino, por fin lo hemos logrado concluir, les agradezco el apoyo que me brindaron en todo momento, las historias, y las risas, para mí fue un enorme placer trabajar a su lado.

A la memoria de todos los animales en los cuales realice mis experimentos, que de forma arbitraria tome sus vidas, gracias por todo.

## Contenido

	PAGINA
<b>Resumen</b>	1
<b>1. Introducción</b>	5
Aspectos históricos	7
Etiología	9
Proteínas de membrana externa	11
Sistema de secreción	13
GspD de la secretina del T2S	15
Patogénesis	16
Diagnóstico	18
Vacunas contra leptospirosis	19
<b>2. Justificación</b>	22
<b>3. Hipótesis</b>	22
<b>4. Objetivo general</b>	23
<b>5. Objetivos particulares</b>	23
<b>6. Material y métodos</b>	23
6.1 conservación de cepas	23
6.2 extracción de ADN plasmidico	24
6.3 Evaluación del constructo por medio de digestión con enzimas de restricción	25
6.4 PCR de ADN plásmico	25
6.5 Ensayos de expresión de GspD recombinante en E. coli y separación de la fracción soluble	26
6.6 Electroforesis de las proteínas totales en geles desnaturalizantes de poliacrilamida	27
6.7 Inmunodetección tipo Western	28
6.8 Purificación de proteínas por etiqueta de poli-Histidinas	29
6.9 Animales	30
6.9.1 Cálculo de dosis letal 50%(DL50)	30
6.9.2 Colección de muestras	32
6.9.3 Vacunación	32
<b>7. Resultados</b>	37
7.1 Detección de la proteína recombinante GspD	37
7.2 Expresión de GspD	38
7.3 Purificación de la proteína GspD	38
7.4 Determinación de la DL50	39
7.5 Ensayo del desafío con la cepa LOCaS 46 de Leptospira Interrogans serovar Canicola	40
7.6 Descripción Macroscópica	48
7.7 Descripción Microscópica	49
<b>8. Discusión</b>	51
<b>9. Conclusiones</b>	59
<b>10. Literatura citada</b>	60
<b>Apéndice</b>	65

## Índice de figuras

- Figura 1.** Ciclo de infección de *Leptospira* sp.
- Figura 2.** Antígenos de superficie de *Leptospira*
- Figura 3.** Representación esquemática de inmunodetección tipo Western
- Figura 4.** Detección de proteína recombinante GspD con enzimas de restricción
- Figura 5.** Detección del gen GspD
- Figura 6.** Presencia de GspD de *Leptospira* por quimioluminiscencia
- Figura 7.** GspD purificada de *Leptospira* por quimioluminiscencia
- Figura 8.** Pulmón de hámster muerto tratado con AIF
- Figura 9.** Pulmón de hámster tratado con AIF
- Figura 10.** PCR de animales tratados con AIF
- Figura 11.** Pulmón de hámster muerto tratado con GspD
- Figura 12.** PCR de animales tratados con GspD
- Figura 13.** Pulmón de hámster muerto tratado con GspD más AIF
- Figura 14.** Pulmón de hámster tratado con GspD más AIF
- Figura 15.** PCR de animales tratados con GspD mas AIF
- Figura 16.** Pulmón de hámster tratado con bacterina LOCaS 46
- Figura 17.** PCR de animales tratados con Bacterina LOCaS 46
- Figura 18.** Porcentaje de lesiones macroscópicas pulmonares
- Figura 19.** Porcentaje de lesiones microscópicas renales

## Abreviaturas

<b>EMJH</b>	Ellinghausen-Mc-Cullough modificado por Johnson y Harris
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>PME</b>	Proteínas de membrana externa
<b>ME</b>	Membrana externa
<b>MI</b>	Membrana interna
<b>TS2</b>	Sistema de secreción tipo 2
<b>TLR</b>	Receptores tipo Toll
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>GSP</b>	Vía general de secreción
<b>AM</b>	Aglutinación microscópica
<b>CO</b>	Campo oscuro
<b>IHA</b>	Hemoaglutinación
<b>IF</b>	Inmunoflorescencia
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>LB</b>	Luria bertani
<b>IPTG</b>	Isopropil-tio- $\beta$ -D-galactosido
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>LD50</b>	Dosis letal 50%
<b>IP</b>	Intraperitoneal
<b>SAF</b>	Solución amortiguadora de fosfatos
<b>AIF</b>	Adyuvante incompleto de Freund

## RESUMEN

La leptospirosis es una zoonosis distribuida alrededor del mundo, afecta a mamíferos y tiene como reservorios a ratas y ratones, los cuales portan al microorganismo en sus túbulos contorneados renales sin manifestar signos clínicos, pero contaminan el suelo y el agua a través de su orina. Es una enfermedad sistémica que se caracteriza por la presencia de fiebre, ictericia, afección renal, hepática, pulmonar y reproductiva; que puede ser leve o grave, dependiendo de la susceptibilidad del hospedero y de la serovariedad involucrada.

En cuanto a los animales domésticos, la vacunación de cerdos, bovinos y perros es eficaz para prevenir la enfermedad, pero no protege por completo contra la infección. Los animales vacunados pueden infectarse sin mostrar signos clínicos, y pueden tener leptospiruria, aunque en menor grado y por menor tiempo que los animales no vacunados. La inmunidad conferida por el lipopolisácarido (LPS) de *Leptospira* es generalmente serovariedad específica. En contraste con el LPS, las proteínas de membrana externa (PMEs) son altamente conservadas entre serovariedades de *Leptospira*. En la actualidad, es un reto desarrollar una bacterina o vacuna eficaz y segura contra la leptospirosis, dado que la enfermedad afecta a diferentes especies domésticas.

El objetivo de este trabajo fue demostrar el grado de protección conferido en hámsteres por una vacuna recombinante formulada con la secretina GspD del Sistema de Secreción Tipo 2 (T2S) de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola.

La investigación se realizó expresando GspD clonada en el plásmido pET14b en *E. coli* BLRDESpLys por inducción con isopropil-tio- $\beta$ -D-galactosido (IPTG); la proteína recombinante se purificó mediante columnas Superflow Ni-NTA. Se confirmó la



presencia de las bandas purificadas de la proteína recombinante mediante inmunodetección tipo Western. Se observaron bandas con un peso aproximado de 63 kDa.

En este estudio se determinó la dosis letal 50% (DL50) en hámsteres para la cepa patógena LOCaS 46 de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola, previamente aislada en tejido renal en perro.

Se utilizaron 4 grupos de hámsteres con 8 animales cada uno, tratados de la siguiente manera: Grupo 1: el grupo testigo, el cual se trató sólo con adyuvante incompleto de Freund. Grupo 2: fue inmunizado en dos ocasiones con 50µg de proteína GspD recombinante. Grupo 3: fue inmunizado en dos ocasiones con 50µg de proteína GspD recombinante adicionada con el adyuvante incompleto de Freund. Grupo 4: se inmunizó con una bacterina formulada con la cepa LOCaS 46 ( $10^9$ ufc/ml), todos los grupos fueron inmunizados en intervalos de dos semanas.

Dos semanas después de la segunda inmunización los cuatro grupos fueron desafiados vía intra-avazonal con 100 DL50% de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola

La sobrevivencia del grupo inmunizado con GspD mas adyuvante fue del 75%, la del grupo con sólo adyuvante fue del 62%, la del grupo bacterina fue del 100%, mientras que el grupo inmunizado sólo con GspD fue de 0%.

Palabras clave: Leptospirosis, vacuna, proteína recombinante

## Abstract

Leptospirosis is a zoonosis distributed around the world, affects mammals and has as reservoirs rats and mice, which carry the microorganism in its renal convoluted tubules without manifesting clinical signs, but contaminate the soil and water through their urine. It is a systemic disease characterized by the presence of fever, jaundice, renal, hepatic, pulmonary and reproductive conditions; Which may be mild or severe, depending on the susceptibility of the host and the serovariety involved. As for domestic animals, vaccination of pigs, cattle and dogs is effective in preventing disease, but does not fully protect against infection. Vaccinated animals may become infected without clinical signs, and may have leptospiuria, although to a lesser extent and for a shorter time than unvaccinated animals. The immunity conferred by the lipopolysaccharide (LPS) of *Leptospira* is generally specific serovariety. In contrast to LPS, outer membrane proteins (PMEs) are highly conserved between serovars of *Leptospira*. At present, it is a challenge to develop an effective and safe bacterin or vaccine against leptospirosis, since the disease affects different domestic species. The objective of this work was to demonstrate the degree of protection conferred in hamsters by a recombinant vaccine formulated with the GspD secretin of the Type 2 Secretion System (T2S) of *Leptospira interrogans* serovariedadade Canicola. This work was performed by expressing GspD cloned in the plasmid pET14b in *E. coli* BLRDESpLys by induction with isopropyl-thio- $\beta$ -D-galactoside (IPTG); The recombinant protein was purified by Superflow Ni-NTA columns. The presence of the purified bands of the

recombinant protein was confirmed by Western immunodetection. Bands with an approximate weight of 63 kDa were observed. In this study we determined the 50% lethal dose (LD50) in hamsters for the pathogenic strain LOCaS 46 of *Leptospira interrogans* serovar Canicola, previously isolated in renal tissue in dogs. Four groups of hamsters were used with 8 animals each, treated as follows: Group 1: the control group, which was treated only with incomplete Freund's adjuvant. Group 2: was immunized twice with 50 µg of recombinant GspD protein. Group 3: twice immunized with 50 µg recombinant GspD protein added with incomplete Freund's adjuvant. Group 4: immunized with a bacterin formulated with strain LOCaS 46 (109uU / ml), all groups were immunized at two week intervals. Two weeks after the second immunization the four groups were challenged intravascularly with 100 LD50% of *Leptospira interrogans* serovarity Canicola. The survival of the group with the most adjuvant GspD was 75%, the group with only adjuvant was 62%, the group of the bacterin group was 100%, whereas the group immunized with GspD alone was 0%.

Key words: Leptospirosis, vaccine, recombinant protein

## Introducción

La leptospirosis es la zoonosis de mayor distribución alrededor del mundo, afecta a mamíferos y tiene como principales reservorios a ratas y ratones, los cuales portan al microorganismo en sus túbulos contorneados renales sin manifestar signos clínicos, pero contaminan el suelo y el agua a través de su orina (Faine, 1999; OMS, 1999; Levett, 2001). Es una enfermedad sistémica que se caracteriza por la presencia de fiebre, ictericia, afección renal, hepática, pulmonar y reproductiva; esta enfermedad puede ser leve o grave, dependiendo de la susceptibilidad del hospedero y de la serovariedad involucrada. (Faine, 1999; Adler y De la Peña-Moctezuma, 2004)

Es considerada una enfermedad ocupacional que afecta a personas que se dedican a la agricultura, limpieza de drenajes, minería y aquellos que tienen contacto con animales. Las principales fuentes de contagio son la orina, líquidos y tejidos fetales de los animales enfermos, portadores asintomáticos y reservorios. La infección por *Leptospira* se asocia a los periodos de lluvia y se presenta tanto en áreas urbanas como rurales de países desarrollados y sub desarrollados. (DGE., 2012)

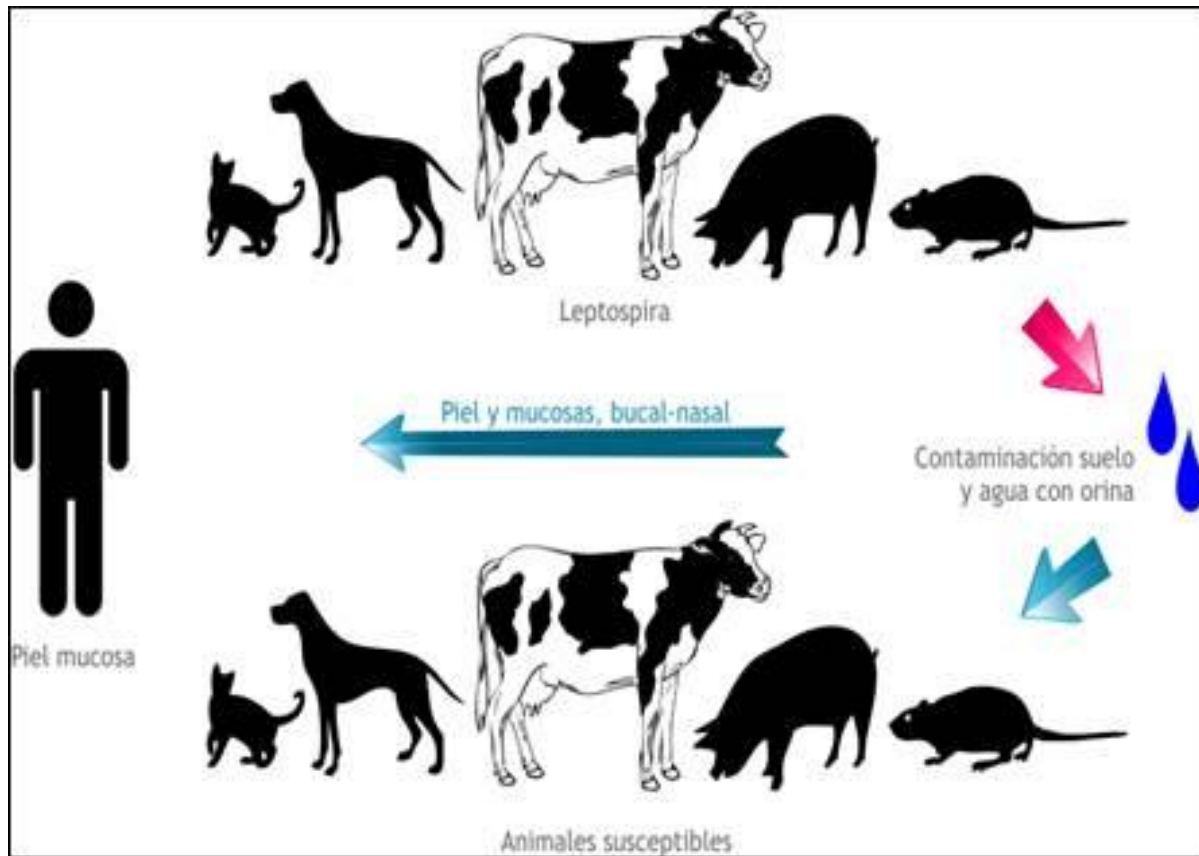


Figura 1.- Ciclo de infección por *Leptospira* sp (<http://www.monografias.com/trabajos102/leptospirosis-problematica-aumento/leptospirosis-problematica-aumento.shtml>)

Los roedores son considerados como reservorios por que comúnmente alojan e sus riñones leptospiras patógenas sin sufrir signos clínicos y las eliminan al ambiente pudiendo infectar animales domésticos y salvajes causando diferentes manifestaciones clínicas y estados de portador. La leptospirosis es transmitida a humanos por contacto directo con la orina de animales portadores o por exposición a medio ambiente contaminado con orina de animales portadores (Ko et al., 2009)

## Aspectos históricos

En humanos es conocida como enfermedad de Weil, enfermedad de los porqueros, fiebre de los arrozales, fiebre de los cañaverales, fiebre del fango, fiebre de los pantanos, fiebre icterohemorrágica y fiebre del verano, entre otros. (K. Sandow, W. Ramirez, 2005). La leptospirosis en rumiantes y cerdos se asocia con abortos, infertilidad, agalactia y nacimiento de crías débiles y en el caso de perros con el daño hepático y renal.

Lacereaux en 1802 hizo la primera descripción clínica de leptospirosis y en 1883 Landarouzi describió un caso típico con ictericia y hemorragias denominándolo tifus hepático. Posteriormente en Alemania Weil publicó en 1916 donde refirió la enfermedad con cuadros agudos febriles con ictericia y manifestaciones de daño renal. Goldschmidt en 1887 fue quien propuso el nombre de enfermedad de Weil. En 1914 los japoneses Inada e Ido encontraron una espiroqueta en el hígado de cuyos infectados con sangre de mineros con cuadros febriles, estos cuyos presentaron cuadros hemorrágicos y es por esta razón que llamaron al agente encontrado *Spirochaeta Icterohaemorrhagiae* (Inada et al. 1916). Este mismo equipo relacionó este microorganismo con el de las ratas de desagüe, encontrando que el 40% de esas ratas eran portadoras de la *Spirochaeta Icterohaemorrhagiae*. Cuando la enfermedad se confundía con la fiebre amarilla (enfermedad vírica aguda y hemorrágica), Noguchi propuso la creación del género *Leptospira* y en 1920 realizó los primeros trabajos sobre leptospirosis en Yucatán

(Noguchi and Kligler, 1920, Varela *et al.*, 1972), encontrando personas y animales seropositivos, principalmente en Campeche, Tabasco, Colima y el Distrito Federal.

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 a 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 portador puede mantener a la bacteria durante largos periodos, incluso toda su vida. Los roedores son los reservorios más importantes de la leptospirosis, las ratas alojan generalmente la serovariedad Icterohaemorrhagiae y los ratones Ballum. En el caso de la leptospirosis no adaptada al hospedero, esta por una exposición a un animal susceptible se presenta una infección accidental con signos clínicos diversos, 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 semiología y las lesiones son más graves en un hospedero accidental. En los animales domésticos puede tener una presentación aguda o crónica cursando con una variada semiología 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).

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 15 días, tiene 2 fases: la leptospiremia, cuando el microorganismo se encuentra en sangre, tiene una duración de 3 a 10 días y la leptospiruria que puede persistir desde una semana hasta varios meses o años, donde el microorganismo se aloja en el riñón y es eliminado a través de la orina, de manera intermitente. La similitud de los síntomas presentes en la leptospirosis con varias enfermedades febriles hace que se confunda con otras, como el dengue o rickettsiosis (OMS, 2008)

## **Etiología**

El género *Leptospira* pertenece al Filo Spirochaetes, Clase Spirochaetia, Orden Spirochaetales y a la Familia Leptospiraceae. (Quinn *et al.*, 2002). Las leptospiras pueden ser patógenas o saprófitas, estas últimas se encuentran en muchos tipos de medio ambiente húmedo, que van desde las aguas superficiales y suelos húmedos con agua de grifo, en agua de mar han sido encontradas leptospiras halófilas saprofitas (Terpstra, 2003).

*Leptospira* es un microorganismo en forma espiral (espiroqueta), que mide de 0.1-0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro por 10 a 20  $\mu\text{m}$  de longitud, con ganchos en ambos extremos, tiene 2 flagelos periplasmáticos fijos en los extremos, que se ubican a todo lo largo y alcanzan 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).



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

La principal fuente tanto de carbono como de energía son los ácidos grasos regularmente de 12-18 carbonos, esta es liberada por  $\beta$ -oxidación, no pudiendo usar azúcares o aminoácidos como fuente de energía (Brooks *et al.*, 2004). Curiosamente esta también es tóxica, por esta razón los medios de cultivo utilizados para su aislamiento requieren de un detoxificante para lo cual regularmente se ocupa la albúmina bovina sérica con ácidos grasos en forma de complejos de sorbitol (Tween), una mezcla de glicerol, iones de amonio y vitaminas como cianocobalamina (Vitamina B12), tiamina (Vitamina B1), hierro, calcio, magnesio (Adler y de la Peña-Moctezuma, 2009). Las leptospiras desarrollan en medios especiales para su cultivo "in vitro" como los medios Fletcher, de Stuart y Korthof los cuales son suplementados con 10% de suero de conejo en soluciones de una mezcla de peptonas, vitaminas y electrolitos, pudiendo ser sólidos, semisólidos y líquidos. El medio Ellinghausen-Mc-Cullough modificado por Johnson y Harris (EMJH), es el medio líquido que desarrolla una

leve turbidez; en medio semisólido el desarrollo típico se concentra en un disco llamado zona o anillo de Dinger correspondiente al nivel de la tensión de oxígeno óptima para estos microorganismos ((Faine et al., 1999; Doern, 2000, Rance, 2004).

El hábitat natural de las leptospiras patógenas son los túbulos renales de animales que funcionan como reservorio o huésped definitivo.

### **Proteínas de membrana externa e Inmunogenicidad**

Tiene una cubierta de doble membrana, la membrana externa está constituida por el lipopolisacárido (LPS) lo que lo hace estructuralmente similar a las bacterias Gram negativas, pero con toxicidad baja para los hospederos infectados. El LPS es el componente principal de la membrana externa, el antígeno dominante durante la infección y base de la clasificación serológica del género (Figura 2) (Ko *et al.*, 2009; De la Peña-Moctezuma, 1999). Los anticuerpos contra el LPS de *Leptospira* son considerados protectores en hámsteres y cuyos; sin embargo, esta es serovariedad-específica, de corta duración (Levett, 2001), y no se dan las mismas condiciones en otras especies como en los bovinos, en donde los títulos de anticuerpos elevados no evitan la infección (Bolin *et al.*, 1989). Por otro lado, otros antígenos superficiales incluyen a las proteínas de membrana externa (PME), que en su mayoría están constituidas por lipoproteínas (LipL32, LipL21, LipL41) (Nally *et al.*, 2006) proteínas integrales de membrana como la porina

OmpL1 (Shang *et al.*, 1995) y del sistema de secreción tipo 2 (TS2)<sup>1</sup>. (Haake *et al.*, 2000). En la ME de serovariedades patógenas de *Leptospira* se han identificado 67 unidades proteicas, demostrando que algunas de estas inducen respuestas inmunes con valor protector variable en animales de laboratorio (Cullen *et al.*, 2002).

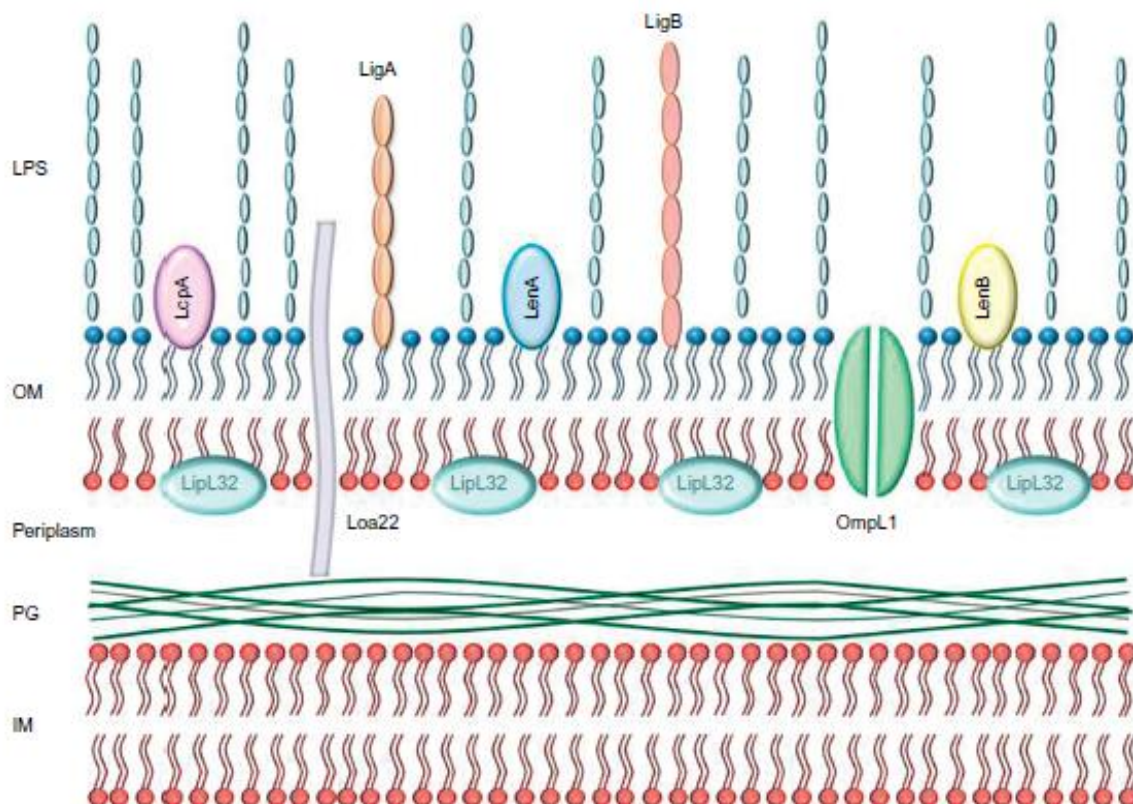


Figura 2. Antígenos de superficie de *Leptospira*

Las proteínas y lipoproteínas en las membranas de *Leptospira*: LPS= Lipopolisacario, OM= Membrana externa, PG= Peptidoglicano, IM= Membrana interna. LipL32, OmpL1, LenA, LenB, LigA, LigB, son proteínas de superficie externa

<sup>1</sup> De la Peña-Moctezuma, comunicación personal.

Las PME de *Leptospira* interactúan con los receptores tipo Toll 2 (TLR 2 por sus siglas en ingles *Toll like receptors*), estimulando la activación de macrófagos e induciendo la producción de quimiocinas proinflamatorias y TNF- $\alpha$ , favoreciendo la inflamación temprana y probablemente el desarrollo de nefritis intersticial (Yang, 2007). La importancia de la interacción de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en ingles *Pathogen-associated molecular patterns*), de *Leptospira* con los TRL se ha observado en ratones desprovistos de TRL2 y TRL4, que muestran susceptibilidad a la infección y mueren rápidamente de falla hepática y renal severas asociadas a la infección (Chassin *et al.*, 2009). Por otra parte, se ha hecho evidente que la fagocitosis de *Leptospira* por neutrófilos y macrófagos es efectiva si el patógeno es opsonizado por inmunoglobulinas G (Fraga *et al.*, 2011).

A raíz de que se reportara PME presentes en serovariedades patógenas de manera conservada, y su ausencia en las no patógenas,, comenzaron a ser evaluadas como inmunogenos alternativos para la prevención de la Leptospirosis.

## **Sistema de secreción bacteriana**

Los sistemas de secreción son un conjunto de estructuras moleculares que le permiten a una proteína sintetizada en el citoplasma salir al espacio extracelular por medio de tres procesos:

Translocación: se refiere al transporte de una proteína a través de membranas biológicas.

Secreción: transporte de una proteína desde el interior hacia el exterior de la célula.

Exportación: transporte de una proteína desde el citoplasma hacia el periplasma de bacterias Gram negativas.

La secreción de proteínas es requerida para muchos procesos del ciclo de vida de las bacterias, incluyendo biogénesis de organelos, adquisición de nutrientes y expresión de factores de virulencia (Thanassi y Hultgren, 2000). La secreción extracelular de proteínas es considerada como el principal mecanismo de virulencia en las infecciones bacterianas. (González-Pedrajo, Dreyfus, 2003)

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

En bacterias Gram negativas, las proteínas a secretarse tienen que atravesar dos barreras lipídicas separadas por el espacio periplásmico: la membrana citosólica o interna (MI) y la ME, para ello, las proteínas son normalmente sintetizadas con un péptido señal en el extremo amino terminal, el péptido señal es el objetivo tanto del sistema Sec como del sistema Tat (*twin-arginine traslocation*); ambos sistemas de translocación transportan la proteína del citoplasma al espacio periplásmico a través de la MI. Los sistemas de secreción que emplean el sistema Sec se

denominan sec dependientes; la diferencia clave entre estos dos consiste en que el sistema Sec transporta polipéptidos en un estado no estructurado, mientras que la vía Tat transporta proteínas que están completamente plegadas.

Una vez que la proteína se encuentra en el espacio periplásmico, esta es transportada al exterior de la célula a través de la ME con ayuda de un sistema de secreción como el T2S, también conocido como la vía general de secreción (gsp por sus siglas en inglés).

### **GspD, la secretina del T2S**

El T2S permite a las bacterias secretar un gran número de proteínas al medio extracelular a través del poro formado por doce copias de la secretina GspD. Esta conservada entre los diferentes T2S, forman una súper familia involucrada en sistemas de transporte de grandes sustratos macromoleculares a través de la membrana externa.

Alcaraz Sosa (2008) demostró por inmunohistoquímica que la secretina GspD es expresada durante la infección experimental con una cepa virulenta de *Leptospira* serovariedad Canicola en hámster, mientras que Rodríguez Reyes (2007), detectó anticuerpos IgG en el suero de animales infectados o sospechosos. En 2009, Núñez Carrera realizó un ensayo de inmunoprotección con GspD de *Leptospira borgpetersenni* (Hardjobovis), en hámsteres desafiados con un aislado virulento (LOCaS46), de la serovariedad Canicola, en el que obtuvo una sobrevivencia del 80% de los la proteína GspD. Sin embargo, el grupo testigo mostro una

supervivencia del 60%. Aunado a esto, Ordoñez López (2010), mostró que los genes que componen el locus *gsp* se encuentran altamente conservados entre cepas Hond Utrecht IV (HU IV) y LOCaS46 (99-100% de homología). La secretina GspD de la serovariedad Canicola de estas dos cepas de *L. interrogans* al ser comparada con otras leptospiras patógenas, mostró una alta homología (*L. interrogans* serovariedad Copenhageni 99%, *L. interrogans* serovariedad Lai 99%, *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjobovis 92%), en tanto que al ser comparada con la serovariedad no patógena (*L. biflexa* serovariedad Patoc), esta homología disminuye considerablemente (62%). En 2014, Hidalgo Ruiz logro la identificación del dominio funcional de GspD, ubicado en la región carboxilo de la proteína, donde se podría realizar la clonación y expresión de esta región con la finalidad de evaluar su capacidad inmunogénica y protectora.

## **Patogénesis**

Las leptospiras penetran por piel lesionada o mucosas; un número muy pequeño de leptospiras (1-10) pueden causar infección fatal en animales susceptibles (Faine, 1998). Se difunden invadiendo el torrente sanguíneo y se diseminan a través de los tejidos, la infección causa un cuadro febril agudo durante la fase de leptospiremia y progresa durante la respuesta inmune tardía hasta causar severas manifestaciones multisistémicas como daño y disfunción hepática, falla renal aguda, síndrome hemorrágico pulmonar, miocarditis y meningitis. Eventualmente, la respuesta inmune elimina las leptospiras patógenas, pero pueden persistir por periodos prolongados en sitios inmunoprivilegiados, como los túbulos renales y el

humor vítreo, donde pueden llegar a causar cuadros de leptospiruria incluso después de semanas de la resolución de la enfermedad y uveítis después de meses de la exposición, respectivamente. Las leptospiras son eliminadas por la orina que puede tener carácter continuo o intermitente y de duración variada, incluso de por vida. (Prescott, 1993; Faine *et al.*, 1999 Ko *et al.*, 2009).

## **Semiología y lesiones**

La lesión primaria en todas las formas de leptospirosis es el daño al endotelio vascular (Faine, 1998) causado por hemolisinas, provocando daños isquémicos y muerte celular (Hauk *et al* 2005).

.Las lesiones más frecuentes se observan en los riñones, donde la necrosis cortical celular, petequias y hemorragias equimóticas ocurren especialmente en los glomérulos y los túbulos contorneados proximales. Sin embargo, el alcance y la gravedad de las lesiones depende de la serovariedad infectante, la edad del animal y el estadio de la enfermedad (Alston JM, Brom JC. 1958, Amatredjo A, Campbell RSF 1975)

Las principales lesiones patológicas que pueden observarse en forma aguda, son anemia, ictericia, hemoglobinuria y hemorragias. En los animales recuperados de la forma aguda de la enfermedad el hallazgo característico es la nefritis intersticial progresiva. En el caso de aborto, en la placenta se puede observar edema y placentitis, en el feto se puede detectar nefritis (Faine, 1999)



Cuadro 1. Presentaciones clínicas y patológicas de leptospirosis en diferentes especies animales.

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

## Diagnóstico

El diagnóstico de leptospirosis es difícil de confirmar debido por un lado, a la gran diversidad de signos clínicos presentes en individuos enfermos, y por otra parte, a la adaptabilidad del microorganismo a las condiciones de laboratorio. Por estos motivos, el diagnóstico se ha basado principalmente en técnicas de laboratorio indirectas como la detección de niveles altos de anticuerpos séricos mediante la prueba de aglutinación microscópica (AM) y la observación de leptospiras mediante microscopia de campo oscuro (CO), siendo esta última, una alternativa con poca sensibilidad y alto grado de inespecificidad. En todo caso es recomendable el uso de otras alternativas de diagnóstico incluyendo histopatología con tinciones argénicas, estudios de laboratorio clínico, pruebas inmunológicas como ELISA, inhibición de la hemoaglutinación (IHA), aglutinación macroscópica (AM), inmunofluorescencia (IF), inmunohistoquímica (IHQ) y más

recientemente la detección de ADN de leptospiras patógenas en muestras clínicas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

## **Vacunas contra leptospirosis**

En cuanto a los animales domésticos, la vacunación de cerdos, bovinos y perros es eficaz para prevenir la enfermedad, pero no protege por completo contra la infección. Los animales vacunados pueden infectarse sin mostrar signos clínicos, y pueden tener leptospirosis, aunque en menor grado y por menor tiempo que los animales no vacunados (Acha, Szyfres, 2001).

La *Leptospira* patógena fue aislada por primera vez en Japón en 1914, un año después, los investigadores japoneses habían inmunizado con éxito a cuyes. Ellos demostraron que la inyección de leptospiras inactivadas con fenol provocó inmunidad protectora en los conejillos de indias, lo que demuestra por primera vez la importancia de los anticuerpos en la inmunidad para leptospiras en un modelo animal (Ido et al. 1916).

Debido a problemas con la antigenicidad, por los componentes de las leptospiras y componentes de los medios de cultivo, las bacterinas para los seres humanos no han ganado aceptación en el mismo grado que para los animales. Los intentos para superar estos problemas han incluido el desarrollo de medios de cultivo libres de proteínas (Torten *et al.* 1973; Christopher *et al.* 1982). Sin embargo, los rendimientos fueron generalmente mucho más pobres que los medios

convencionales. Las bacterinas en humanos han sido utilizadas con éxito en varias regiones, incluyendo China, Japón, Cuba y Europa.

Uno de los inconvenientes de las bacterinas, es que la inmunidad provocada se dirige principalmente contra el LPS de *Leptospira*, un antígeno T-independiente, y por lo tanto implica anticuerpos IgM, y la falta de respuesta de memoria. Provoca la 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). La duración de la inmunidad es relativamente corta, recomendando una vacunación anual en casi todos los casos. (Adler B., 2014)

En la actualidad, es un reto 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, el LPS, las lipoproteínas, otras proteínas de membrana externa y algunos posibles factores de virulencia (Li *et al.*, Shimizu *et al.*, Haake *et al.* 1999, Cullen *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. La inmunidad humoral es el

tipo de respuesta inmune más estudiada en el caso de leptospirosis (Heath y Johnson, 1994).

Se ha examinado la capacidad inmunoprotectora de otros antígenos proteicos que son reconocidos por anticuerpos producidos durante la infección por *Leptospira* como es la lipoproteína LipL41, en combinación con la porina transmembranal OmpL1 (proteínas recombinantes expresadas en *E. coli*) confieren inmunoprotección sinérgica en hámsteres desafiados con la serovariedad Grippotyphosa. Paradójicamente estas mismas proteínas no son protectoras cuando se administran individualmente (Shang *et al.*, 1995; Haake *et al.*, 1999). Por otro lado, la combinación de OmpL1 con la lipoproteína de membrana externa LipL32, demostró que no tiene capacidad protectora sinérgica, en comparación con lo reportado con LipL41 y OmpL1.

LipL32 es la proteína inmunodominante y la más abundante de membrana externa, así mismo también es la más conservada entre varias serovariedades de *Leptospira*. Estudios de inmunohistoquímica demostraron una reactividad intensa contra LipL32 en riñones de hámsteres infectados con la serovariedad Grippotyphosa que resulta consistente con una expresión *in vivo* (Shang *et al.*, 1996; Hakke *et al.*, 2000; Brager *et al.*, 2001). También es la proteína de *Leptospira* más estudiada. Su capacidad para provocar una inmunidad protectora contra la infección aguda con varios serovares se ha informado muchas veces. Sin embargo, una evaluación rigurosa revela importantes deficiencias en muchos de estos informes, donde los problemas más comunes son el uso de dosis

inadecuadas para el desafío, pequeños grupos de animales, y un análisis estadístico inadecuado. (Murray, 2013, Adler B., 2014)

Por otra parte se han hecho estudios que demuestran que la secretina GspD tiene una alta homología entre diferentes serovariedades patógenas, es expresada durante la infección y es antigénica. Sin embargo, se desconoce el potencial inmunológico de esta proteína (Mena, 2006; Rodríguez, 2007; Alcaraz, 2008)

## **Justificación**

Las bacterinas actuales que confieren inmunidad contra la serovariedad específica, inducen un estrecho margen de protección, además de inmunidad conferida de corta duración.

Las membranas externas de leptospiras patógenas contienen proteínas que son altamente conservadas pudiendo generar una inmunidad cruzada y potencialmente de mayor duración.

## **Hipótesis**

Una vacuna elaborada a partir de la proteína GspD recombinante de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola será capaz de generar una respuesta inmune contra la infección homóloga en hámsteres y evitar así la infección y transmisión de la enfermedad.

## Objetivo general

Demostrar el grado de protección conferido en hámsteres por una vacuna recombinante formulada con la secretina GspD de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola.

## Objetivos particulares

- Expresar la secretina GspD de *Leptospira interrogans* en *E. coli* BLRDE3pLyS
- Purificar la secretina recombinante GspD de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola
- Establecer una vía de inoculación alterna, que semeje más la manera de infección natural, así como la dosis para el desafío.
- Formular una vacuna con adyuvante incompleto de Freund
- Inmunizar hámsteres con la proteína recombinante formulada
- Evaluar la respuesta inmune mediante el desafío con la cepa homóloga y valorar la protección contra la infección y la respuesta inmune en suero

## Material y métodos

### 6.1 Conservación de cepas

Se utilizó una *E. coli* cepa BLRpLyS recombinante. La cepa contiene el plásmido pET14b con un inserto de 1749 pb correspondiente a la secuencia parcial del gen de GspD de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS 46. La

cual fue inoculada en una caja con agar Luria bertani (LB) sobre toda la superficie dejándola incubando 24 horas a una temperatura de 37°C. Una vez que la superficie de la caja se cubrió completamente, se colocaron 5ml de medio LB con ampicilina y con un asa de vidrio se raspó la superficie para despegar el cultivo del agar, después se tomaron 0.7 ml y se colocaron en crioviales que contenían 0.7 ml de glicerol estéril, y fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

## **6.2 Extracción de ADN plasmídico**

La extracción del plásmido recombinante pET14b-GspD se realizó por el método de lisis alcalina.

*E. coli* cepa BLRDE3pLyS conteniendo pET14b-gspD fue cultivada en 5ml de caldo LB Amp e incubada 24h a 37°C en agitación orbital a 190 rpm (SHEELLAB S16). Posteriormente, el cultivo fue dispensado en tubos de 1.5 ml y centrifugado a 13,000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente (Eppendorf MR1812), eliminando el sobrenadante.

Para la prueba de extracción de plásmido se utilizó un paquete comercial (QIAprep Spin Miniprep Kit Qiagen<sup>R</sup>) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El plásmido extraído se almacenó en refrigeración hasta su uso.

### **6.3 Evaluación del constructo por medio de digestión con enzimas de restricción**

Se realizó una digestión enzimática del plásmido con dos enzimas de restricción, *Bam*H I y *Bgl* II, incubando la mezcla a una temperatura de 37°C por 2 horas, después los productos de digestión fueron separados en un gel de agarosa por electroforesis.

### **6.4 PCR de ADN plásmico**

Con la finalidad de confirmar la presencia del inserto de GspD, se amplificó el gen de gspD, se realizó la PCR del ADN plásmico utilizando los siguientes iniciadores:

- T7 Promoter primer (TAATACGACTCACTATAGG)
- T7 Terminator primer (GCTAGTTATTGCTCAGCGG)

La PCR se realizó con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial del ADN a 94°C durante 5 minutos, posterior a esto 30 ciclos constituidos por tres fases cada ciclo: una fase de desnaturalización del ADN a 94°C durante 30 segundos, seguido por una fase de alineación de los iniciadores a 50°C durante 50 segundos, y el ciclo termina con una fase de extensión a 72°C durante 1 minuto con 30 segundos. Una vez culminados los 30 ciclos la reacción de la PCR finaliza con una etapa de extensión final a 72°C durante 7 minutos.



## **6.5 Ensayos de expresión de GspD recombinante en *E. coli* y separación de la fracción soluble**

De las cepas previamente conservadas en congelación, se tomó una réplica y se sembraron tres asadas a un tubo de 10 ml de medio LB con ampicilina (50 µl/ml), incubándolo 24 horas a 37°C con agitación orbital a 200 rpm. Una vez transcurrido el tiempo se inocularon 4 ml del cultivo previamente incubado en 100ml de medio LBamp en un matraz de 500ml y se incubó a 37°C en agitación orbital a 200 rpm hasta que alcanzó un valor de absorbancia de 0.6 con una longitud de onda de 600 nanómetros (O.D. 600) determinada en espectrofotómetro (Jenway® 6305). Los cultivos fueron inducidos con IPTG a una concentración de 1 mM incubándolos a 17°C (Thermo MaxQ® 4450 conectado a un baño de circulación BROOKFIELD® TC502), y manteniéndolos en agitación orbital a 200 rpm, por 24 horas

Al finalizar el tiempo de incubación, el cultivo fue centrifugado a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C, el sobrenadante se eliminó y el sedimento de bacterias fue resuspendido en 997.5µl de reactivo Bug Buster (BugBuster, Novagen®), 0.3µl de DNasa pancreática bovina y 2.5µl de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Affymetrix®), mezclándolo gentilmente con una pipeta, colocando la mezcla en una plataforma de agitación a una velocidad 20 rpm durante 20 minutos, a temperatura ambiente (dual action shaker®). La muestra fue entonces centrifugada a 1000rpm durante 20 minutos a 4°C transfiriendo el sobrenadante

(fracción soluble) a un tubo nuevo y resuspendiendo la pastilla (fracción no soluble) con Bug buster y congelándolo a -20°C hasta su uso.

## **6.6 Electroforesis de las proteínas totales en geles desnaturizantes de poliacrilamida**

Las proteínas totales obtenidas por BugBuster, fueron suspendidas, agregando 45µl de la pastilla resuspendida y 15µl de LDS buffer (NuPage®). Las suspensiones se hirvieron durante 5 min en baño María y posteriormente fueron centrifugadas a 13,000 rpm a TA durante 5 min.

Se preparó un gel desnaturizante de poliacrilamida-SDS al 12.0 % (gel separador), con un grosor de 1 mm, polimerizando durante 30 minutos a temperatura ambiente, después en la parte superior se preparó un gel al 4.0 % (gel concentrador) con mismo grosor. La composición de los geles y de las soluciones amortiguadoras se preparó de acuerdo a la técnica de Laemmli (1970). Los geles se colocaron en una cámara de electroforesis vertical, con solución amortiguadora para corrimiento (NuPage Running buffer®). Al finalizar la electroforesis el gel fue teñido con azul de Coomassie (Biorad®), manteniéndolo en inmersión, después se retiró la tinción y se decoloró con agua, cambiando el agua hasta la decoloración del gel. Posteriormente se colocó el gel en un bastidor con papel celofán dulce para su registro fotográfico y conservación.

## 6.7 Inmunodetección tipo Western

Para detectar la proteína recombinante GspD se realizó la prueba de inmunodetección tipo Western.

Después de realizar la electroforesis de las proteínas en un gel desnaturalizante de poliacrilamida-SDS al 12% en una cámara de electroforesis vertical, se realizó la transferencia a una membrana de PVDF (Millipore®). Primero, se sumergió la membrana cortada al tamaño del gel en metanol absoluto frío durante 15 segundos, luego durante 5 minutos en solución de transferencia (Transfer buffer NuPAGE®), el gel de poliacrilamida se mantuvo en la misma solución, se ensambló el cartucho en un recipiente con la misma solución.

Después de colocó la cámara de electroforesis dentro de un recipiente con refrigerantes y se llenó con amortiguador de transferencia frío.



Figura 3. Representación esquemática de los componentes requeridos para la inmunoelectrotransferencia de proteínas de un gel de poliacrilamida SDS a una membrana de nitrocelulosa

Se transfirieron la proteínas del gel a la membrana a 100 volts durante 60 minutos, al termino del tiempo, la membrana se lavó 3 veces con PBS, durante 5 minutos, luego se bloqueo la membrana con PBS-T con 5% de leche descremada durante 1 hora y después se incubaba la membrana con un anticuerpo primario Anti-6X His tag (Abcam<sup>®</sup>), durante 2 horas, a temperatura ambiente. Después, la membrana se lavó tres veces con PBS-T durante 5 minutos, todos lo lavados en agitación orbital a 15 rpm. Se incubó la membrana con el anticuerpo secundario goat anti-mouse IgG H&L (HRP) (Abcam<sup>®</sup>) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó tres veces con PBS-T y después se colocó la membrana en un sistema de detección a base de quimioluminiscencia (ECL Prime western blotting detection reagent, GE Healthcare<sup>®</sup>), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se visualizó el resultado por medio de placas radiográficas.

## **6.8 Purificación de proteínas por etiqueta de poli-Histidina**

La poli-histidina es uno de los sistemas de etiquetado de proteínas más usados, que se basa en la afinidad de múltiples histidinas en tándem, con iones metálicos inmovilizados (níquel). Los metales son retenidos por agentes quelantes, como el ácido nitrotriacético Ni-TA, con grupos reactivos, unidos covalentemente a un soporte sólido. Una etiqueta de histidinas fusionada a la proteína de interés se une a los cationes divalentes del ion, inmovilizados en la resina de la columna de afinidad. Las proteínas que no se unen se eliminan y la proteína de interés es recobrada posteriormente por elusión reduciendo el pH. Bajo estas condiciones la proteína etiquetada no puede unirse a los iones y se disocia de la resina.

El procedimiento se realizó de acuerdo al manual de purificación de proteínas marcadas con 6xHis de *E. coli* utilizando columnas Superflow Ni-NTA (Qiagen®)

Una vez obtenido el purificado, se realizó de nuevo la técnica de Western blott previamente descrita, para volver a visualizar la proteína ya purificada.

## **6.9 Animales**

Para el establecimiento de la dosis letal 50% (LD50) se utilizó como modelo experimental 24 hámsteres, sirio dorado (*Mesocricetus auratus*), de 13 semanas de edad

Los hámsteres fueron mantenidos bajo condiciones de aislamiento con cama de viruta de madera esterilizada por autoclave, alimento y agua ad libitum, como marcan las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana **NOM-062-ZOO-1999**, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. El protocolo fue aprobado por el Subcomite Institucional para el Cuidado de Animales en Experimentación (SICUAE), con el número **MC2014-27**

### **6.9.1 Cálculo de la dosis letal 50% (DL50)**

Se estableció la DL50 de la cepa LOCaS46 serovariedad Canicola de *Leptospira interrogans*, proveniente de cultivo de un riñón de perro naturalmente infectado con el microorganismo y de probada virulencia (Castillo SLO, Ramírez OJM, Carmona GCA, de la Peña MA, 2010)

Para preparar la semilla usada para la infección, se inoculó un hámster por vía intraperitoneal (IP) con *Leptospira* virulenta de la cepa LOCaS46, posteriormente se recuperó al microorganismo en medio EMJH líquido a partir de muestras de riñón, hígado y orina del animal infectado. Los cultivos se incubaron durante 10 días a 30°C (Precision Scientific Co. Thelco), el desarrollo y viabilidad se verificaron por medio de observación microscópica de campo oscuro (CO) (Karl Zeiss), finalmente los cultivos (pase cero) se usaron para inocular a los hámsteres para el cálculo de la DL50. El conteo de leptospiras para el inóculo se realizó en una cámara Petroff Hausser (HAUSSER SCIENTIFIC®). Posteriormente, se realizaron diluciones del cultivo virulento (cepa LOCaS46) en medio EMJH líquido, a fin de obtener una concentración de leptospiras de 40, 16, 4 /microorganismos/ 0.25 ml, para la ruta intraperitoneal. Se inocularon 3 grupos de hámsteres por vía IP con 0.25 ml, previa desinfección de la región abdominal con alcohol al 70%, se observaron diariamente durante los posteriores días después del desafío, registrando las muertes ocurridas por día. A los animales que sobrevivieron a la infección se les aplicó la eutanasia después del día 18 post-inoculación sangrándolos en blanco por punción cardíaca con previa anestesia.

Posteriormente, se realizó un nuevo estudio, inoculando 3 grupos de hámsteres, por vía sub- mucosa oral (intraavazonal), realizando el mismo procedimiento que en el estudio anterior, hasta obtener una concentración de leptospiras de 4000, 400 y 40 microorganismos/0.25ml. Los animales fueron observados diariamente, registrando comportamiento y peso tomando como criterio que no bajaran más del 10% del peso inicial, registrando las muertes ocurridas por día.

## 6.9.2 Colección de muestras

Tanto de los hámsteres que murieron como los que sobrevivieron a la infección experimental, se colectaron muestras de riñón e hígado, para su recolección se realizó una incisión longitudinal por línea media de la región abdominal, previa descontaminación con alcohol al 70% y cloruro de benzalconio al 0.05%. Una vez expuesta la cavidad abdominal se extirpó un riñón y retiró una porción de hígado con una tijera de disección y unas pinzas de disección planas, esterilizadas por autoclave. Los órganos se colocaron por separado en el interior de una jeringa de 3 ml (después de haber retirado el émbolo), y se expulsó a través de la aguja, con la finalidad de obtener un macerado y utilizarlo inmediatamente para el cultivo bacteriológico y para la detección de ADN de *Leptospira* mediante la técnica de PCR.

## 6.9.3 Vacunación

### Formulación de bacterina

Para el cultivo la cepa de *Leptospira*, se utilizaron 200 ml de medio EMJH, este fue inoculado con 10 ml de cultivo de leptospiras viables desarrolladas también en EMJH. El cultivo se incubó a 30°C en una estufa bacteriológica por 15 días, o hasta que alcanzara una densidad de  $2.4 \times 10^8$  microorganismos/ ml. La viabilidad y densidad se supervisaron mediante la observación microscópica por CO y por conteo de leptospiras en una cámara de Petroff-Häusser (HAUSSER SCIENTIFIC®).

Los cultivos se centrifugaron a 16,000 xg durante 30 minutos (JOUAN, MR 1812), posteriormente se decanto el sobrenadante dejando la pastilla bacteriana en el tubo y se realizaron dos lavados con solución amortiguadora de fosfatos (SAF) estéril adicionando a la pastilla bacteriana 20 ml y homogenizando gentilmente, posteriormente se centrifugo nuevamente y se decantó el sobrenadante. Terminado el último lavado se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla bacteriana con 10 ml de SAF, el microorganismo se inactivó adicionando una concentración final de 10% de formol durante 24 horas en agitación lenta (50 rpm). La inactivación total del microorganismo se verificó mediante la observación microscópica por CO del cultivo confirmando la ausencia de motilidad. El cultivo inactivado, se centrifugó a 16,000 xg durante 30 minutos y posteriormente se realizaron dos lavados con SAF. La pastilla bacteriana se resuspendió en 10 ml de SAF y se realizó un conteo de leptospiras en la cámara Petroff-Häusser (HAUSSER SCIENTIFIC ®). Finalmente, la bacterina se diluyó con SAF hasta obtener una concentración de  $2.4 \times 10^9$  de *Leptospiras* inactivadas/ ml.

La bacterina fue emulsificada con adyuvante incompleto de Freund (Sigma) con una relación 1:1. La mezcla fue emulsificada 12 minutos previos a su inoculación.

En una jeringa se mezcló 50µl de solución de proteína GspD purificada con adyuvante incompleto de Freund (Sigma) con una relación 1:1; la mezcla fue emulsificada durante 15 minutos previos a la inoculación.

En el caso del grupo con GspD sin adyuvante, se inocularon 50 µl de proteína GspD purificada.



## Esquema de vacunación

Se utilizaron 32 hámsteres de la raza sirio dorado (*Mesocricetus auratus*), de 8 semanas de edad de aproximadamente 90g de peso. Se agruparon en 4 grupos de 8 ejemplares cada uno.

- Grupo 1: fue el grupo testigo, el cual se trató solo con adyuvante incompleto de Freund.
- Grupo 2: se inmunizó con la proteína GspD recombinante sola.
- Grupo 3: se inmunizó con la proteína GspD recombinante y adyuvante incompleto de Freund
- Grupo 4: se inmunizó con una bacterina LOCaS 46 ( $10^9$  de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS 46 inactivadas / ml)

Se realizaron dos inmunizaciones con 14 días de diferencia entre cada una (día 14 y día 28). Los animales fueron desafiados 14 días después de la segunda inmunización (día 45), inoculando 100 dosis letales 50% en hámster (DL50) de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS 46 virulenta en 0.1ml de medio EMJH. El desafío se hizo por vía intraavazonal. Los animales se observaron durante los siguientes 14 días después del desafío. A los animales que sobrevivieron a la infección se les aplicó eutanasia después del día 18 post-inoculación sangrándolos en blanco por punción cardiaca, previa anestesia con ketamina-xilasina.

Para evaluar si la vacuna indujo una respuesta inmune contra la serovariedad homóloga, se considero como satisfactorio el 80% de supervivencia de animales inmunizados y desafiados, contra un 80% de mortalidad con los animales del grupo testigo desafiado sin inmunizar.

De los sueros colectados previamente, se determinó el titulo de anticuerpos mediante la prueba de AM

Para la realización de la AM, se ocupó un cultivo de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS 46, en medio liquido EMJH y con un desarrollo similar a la turbidez de 0.5 en la escala de McFarland. A las muestras séricas de los hámsteres se les realizaron 6 diluciones dobles a partir de la dilución 1:5, empleando placas de 96 pozos de fondo plano. Se agregaron 35µl del antígeno a todos los pozos, se agitó suavemente y se incubó a 30°C durante 90 minutos, transcurrido el tiempo se revisó en un microscopio de campo oscuro con un objetivo corto de 10X.

Se realizó la necropsia de los animales para colectar hígado y riñón con la finalidad de obtener un macerado y utilizarlo inmediatamente para el cultivo bacteriológico y para la detección de ADN de *Leptospira* mediante la técnica de PCR.

Se realizaron cortes histológicos de riñón para evaluar el grado de lesión sobre el tejido.

## **Aislamiento**

De todos los animales se colectaron muestras de hígado y riñón de forma aséptica. Estas fueron maceradas en jeringas e inoculadas en medio semisólido Fletcher, los cuales fueron incubados a 30°C.

## **Extracción de ADN**

De las muestras de riñón e hígado se tomaron 25mg de tejido macerado y a partir de este se hizo la extracción de ADN con el paquete comercial QIAmp DNA Mini Kit<sup>®</sup> siguiendo el protocolo señalado por el fabricante.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Detección de la proteína recombinante GspD

La presencia de pET-14 en colonias recombinantes de reciente transformación que desarrollaron en LB Amp, fueron confirmadas mediante digestión enzimática con las enzimas *Bam*HI y *Bgl* II, y PCR con los iniciadores BAP1230 y BAP1231

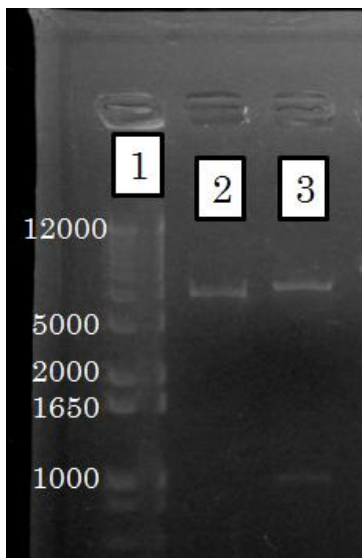


Figura 4. Detección de la proteína recombinante GspD con enzimas de restricción. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: plásmido pET 14 con inserto, con un peso de 6420bp. Carril 3: digestión enzimática con las enzimas *Bam*HI y *Bgl* II. El peso del inserto es de 1749 bp, el gen GspD de *Leptospira interrogans* tiene 2 sitios de corte de *Bgl* II, después del segundo corte se visualizan 1012 pb.

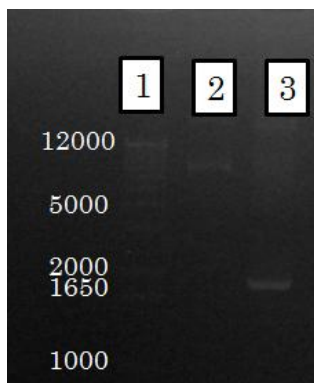


Figura 5. Detección del gen gspD por PCR. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: plásmido pET 14 con un peso de 6420 bp. Carril 3: gen GspD con un peso de 1749 bp.

## 7.2 Expresión de GspD

La expresión de GspD en los cultivos inducidos con IPTG, se confirmó mediante inmunotransferencia tipo Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal Anti-6x His-tag, y como anticuerpo secundario goat anti-mouse IgG H&L (HRP). Observando la presencia de bandas en la placa radiográfica, correspondientes con el peso aproximado de 63 kDa, en la fracción no soluble.

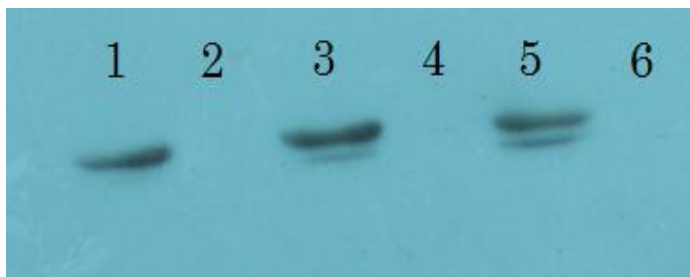
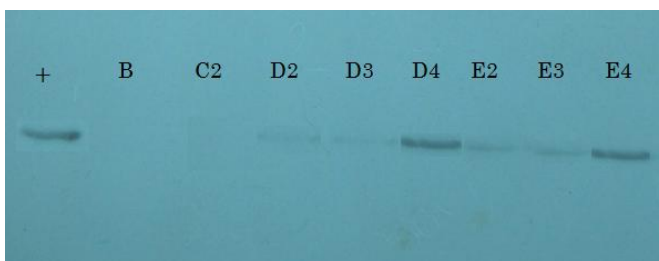


Figura 6. Presencia de GspD de *Leptospira* visualizada por inmunotransferencia tipo Western, visualizado por quimioluminiscencia. Carriles 1, 3 y 5: proteína recombinante GspD fracción no soluble. Carriles 2, 4 y 6: proteína recombinante GspD fracción soluble.

## 7.3 Purificación de la proteína GspD

Tras la demostración de la proteína GspD mediante inmunodetección tipo Western blot, se purificó utilizando columnas Superflow Ni-NTA. Se confirmó la presencia de las bandas purificadas de la proteína recombinante nuevamente mediante inmunodetección tipo Western blot. Se observaron bandas con un peso aproximado de 63 kDa.



E4: Soluciones de elusión.

Figura 7. GspD purificada de *Leptospira interrogans* visualizada por inmunotransferencia tipo Western visualizado por quimioluminiscencia. +: Proteína GspD sin purificar. Con un peso de 66KD. B: Solución de lisis, C2: Solución de lavado, D2, D3, D4, E2, E3,

## **7.4 Determinación de la DL 50% en hámster**

### **7.4.1 Activación de la cepa**

Los dos hámsteres inoculados con la cepa LOCaS 46 mostraron una semiología característica de leptospirosis en esta especie, la muerte se presentó a los 5 días post inoculación y se observó la presencia de leptospiras en el microscopio de campo oscuro, principalmente en frotis de hígado y riñón,

### **7.4.2 Dosis letal 50%**

El resultado de la DL50% para el aislado virulento de *L. interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS 46 en hámster fue de 2.3 leptospiras calculado mediante la técnica de Reed & Muench., utilizando como vía de inoculación la vía intraperitoneal, y por la vía sub mucosa oral fue de 40 leptospiras.

La mayoría de los animales (más del 50%) de los grupos inoculados con las diferentes diluciones (40, 16, 4 por la vía IP y 4000, 400, 40 por la vía sub mucosa oral) comenzaron a presentar semiología de leptospirosis entre los días 7-10 post inoculación. Signos de depresión, anorexia, deshidratación, signos nerviosos como incoordinación, debilidad muscular, baja de peso corporal (menor al 10% del peso inicial) y posteriormente la muerte.

En todos los animales las principales lesiones se presentaron en pulmones con hemorragias petequiales, riñones e hígado con congestión severa y aumento de

tamaño, el hígado presentaba una consistencia friable. En el cultivo bacteriológico de *Leptospira* se logro el aislamiento del microorganismo en hígado, y riñón.

Debido a que la vía intraavazonal es la más cercana a una infección natural, decidimos utilizarla para realizar el desafío en los animales.

### **7.5 Ensayo del desafío con cepa LOCaS 46 de *Leptospira interrogans* serovar Canicola.**

Se registró el número de animales muertos y sobrevivientes al desafío.

<b>Esquema de desafío (animales muertos y sobrevivientes)</b>				
<b>Grupo</b>	Inmunización	No de animales		
		Total	Muertos	Sobrevivientes
<b>Grupo 1</b>	Testigo AIF	8	3	5
<b>Grupo 2</b>	GspD	8	8	0
<b>Grupo 3</b>	GspD + AIF	8	2	6
<b>Grupo 4</b>	Testigo Bacterina	8	0	8

AIF: Adyuvante incompleto de Freun

### 7.5.1 Grupo 1: Testigo adyuvante

De los hámsteres que solo recibieron adyuvante y posteriormente fueron desafiados murieron 3 animales con semiología de leptospirosis, presentando depresión, anorexia, pérdida de peso (menor al 10% del peso inicial), la orina se notaba translúcida así como hematuria (la orina de un hámster sano normalmente es de color blanquecino debido al alto contenido de sales). A la necropsia, los pulmones mostraron, hemorragias petequiales y congestión, el hígado presentó congestión, al igual que el riñón, ambos órganos presentaron una consistencia frías.

Los 5 animales que sobrevivieron no presentaron semiología sugerente a leptospirosis, a la necropsia no mostraron cambios morfológicos aparentes.

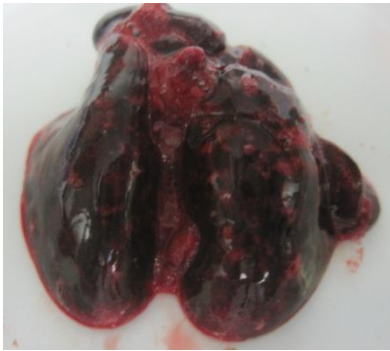


Figura 8.

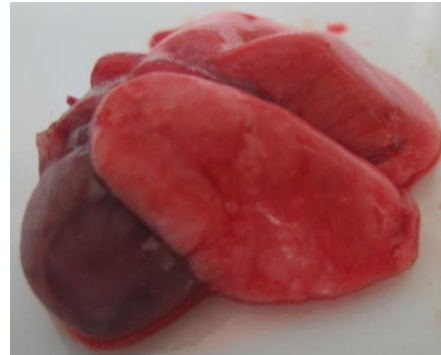


Figura 9.

Figura 8: Pulmón de hámster muerto tratado con adyuvante incompleto de Freund y desafiado con *L. interrogans* Canicola cepa LOCaS 46, donde se muestran lesiones macroscópicas en el tejido pulmonar como hemorragias por sufusión multifocales, Figura 9: Pulmón de un hámster tratado con adyuvante incompleto de Freund y desafiado con *L. interrogans* Canicola cepa LOCaS 46, hámster clínicamente sano sin lesiones macroscópicas aparentes.



Los resultados del aislamiento, aglutinación microscópica y PCR se resumen en el siguiente cuadro.

Grupo	Hámster	Muerte/ eutanasia	Campo oscuro		Cultivo		MAT	PCR
			Hígado	Riñón	Hígado	Riñón		
AIF	3	Muerte	++	+	*	*	25	*
AIF	7	Muerte	++	++	*	*	100	*
AIF	8	Muerte	N	Escaso	*	*	200	*
AIF	1	Eutanasia	+	Sospechoso	-	-	400	*
AIF	2	Eutanasia	Sospechoso	+	-	-	200	*
AIF	4	Eutanasia	Sospechoso	Sospechoso	-	-	100	*
AIF	5	Eutanasia	+	+	-	-	50	*
AIF	6	Eutanasia	+	+	-	-	50	*

AIF: Adyuvante incompleto de Freund

+: de 2 a 5 Leptospiras por campo

++: de 5 a 10 Leptospiras por campo

+++ : >10 leptospiras por campo

\*: Positivo

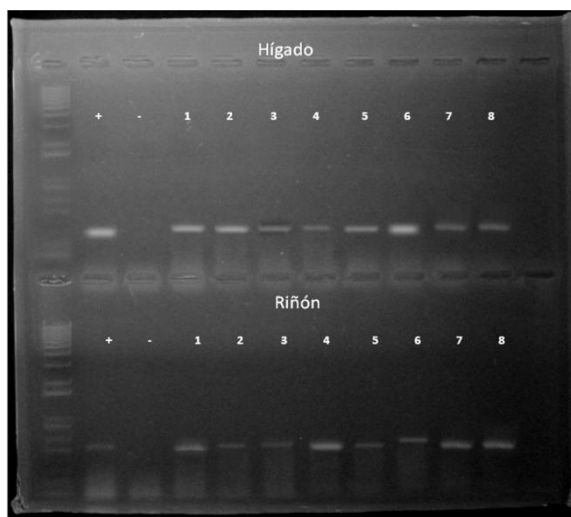


Figura 10.- PCR positivo de hámsteres infectados con 400 *Leptospiras* de la cepa LOCaS46 que fueron utilizados durante el desafío. +: Control positivo de ADN de la cepa LOCaS 46, banda de ADN de 1749 bp. -: Control negativo, agua destilada, 1-8: Muestras de hígado y riñón de los hámsteres pertenecientes a este grupo.

### 7.5.2 Grupo 2: GspD

De los hámsteres que fueron inmunizados solo con la proteína GspD y posteriormente desafiados, se realizó la eutanasia de 2 animales (una hembra y un macho) ya que presentaron el pelo hirsuto y se mostraban menos activos, al realizar el pesaje se comprobó que estaban bajando de peso (menos del 10% del peso inicial). . Al intentar el sangrado en blanco de la hembra, se encontró líquido en cavidad abdominal, de color amarillo turbio, a la necropsia, el cuerno derecho del útero se encontraba aumentado de tamaño. Los demás animales se encontraron muertos, (entre el día 9 y día 10) también presentaron pérdida de peso (aproximadamente 10%) y la piel ligeramente ictérica al igual que en los otros animales pertenecientes a este grupo, los pulmones presentaron hemorragias petequiales, hígado y riñones congestionados.



Figura 11: Pulmón de hámster muerto tratado con la proteína recombinante GspD y desafiado con *L. interrogans* Canicola cepa LOCaS 46, donde se muestran lesiones macroscópicas en el tejido pulmonar como hemorragias petequiales multifocales.

Los resultados del aislamiento, aglutinación microscópica y PCR se resumen en el siguiente cuadro.

Grupo	Hámster	Muerte/ eutanasia	Campo oscuro		Cultivo		MAT	PCR
			Hígado	Riñón	Hígado	Riñón		
GspD	1	Muerte	+	Escaso	*	*	200	*
GspD	2	Muerte	+	++	*	*	200	*
GspD	3	Muerte	++++	+++	*	*	100	*
GspD	4	Muerte	++++	++	*	*	50	*
GspD	5	Muerte	+	Escaso	*	*	50	*
GspD	6	Muerte	+++	+++	*	*	200	*
GspD	7	Muerte	++	++	*	*	400	*
GspD	8	Muerte	++	++	*	*	100	*

+: de 2 a 5 Leptospiras por campo  
 ++: de 5 a 10 Leptospiras por campo  
 +++: >10 leptospiras por campo  
 \*: Positivo

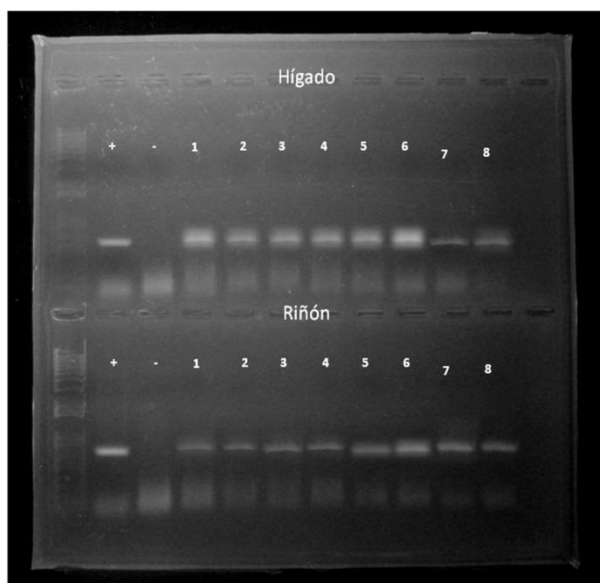


Figura 12.- PCR de hámsteres infectados con 400 *Leptospiras* de la cepa LOCaS46 que fueron utilizados durante el desafío. +: Control positivo de ADN de la cepa LOCaS 46, banda de ADN de 1749 bp. -: Control negativo, agua destilada, 1-8: Muestras de hígado y riñón de los hámsteres pertenecientes a este grupo.

### 7.5.3 Grupo 3: GspD + adyuvante

De los hámsteres que fueron inmunizados y posteriormente desafiados, se realizó la eutanasia de 1 animal, el cual presentaba convulsiones, al pesaje se comprobó la pérdida de peso, también se encontró un hámster muerto, ambos animales presentaron hemorragias petequiales en pulmón, hígado y riñón congestionados.

El hámster 2 fue eutanasiado en el día 25, ya que presentó inapetencia, inactividad y pérdida de peso (aproximadamente el 10%) al realizar la necropsia el pulmón y el hígado no mostraban lesiones macroscópicas, los riñones presentaban el parénquima de apariencia irregular, la orina se notaba translúcida. Los animales sobrevivientes fueron eutanasiados a partir del día 35 sin mostrar cambios morfológicos aparentes.

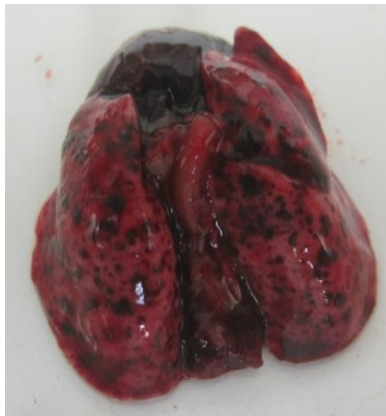


Figura 13.

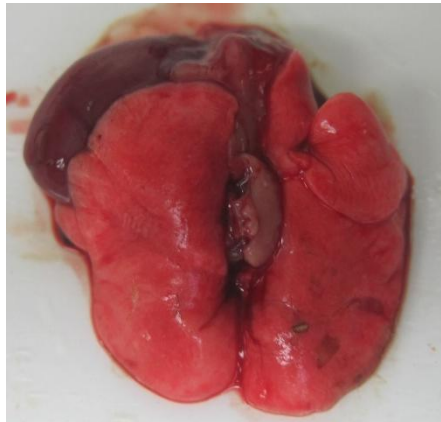


Figura 14

Figura 13: Pulmón de hámster muerto tratado con la proteína recombinante GspD mas adyuvante incompleto de Freund y desafiado con *L. interrogans* Canicola cepa LOCaS 46, donde se muestran lesiones macroscópicas en el tejido pulmonar como hemorragias petequiales multifocales. Figura 14: Pulmón de un hámster tratado con la proteína recombinante GspD mas adyuvante incompleto de Freund y desafiado con *L. interrogans* Canicola cepa LOCaS 46, hámster clínicamente sano sin lesiones macroscópicas aparentes.

Los resultados del aislamiento, aglutinación microscópica y PCR se resumen en el siguiente cuadro.

Grupo	Hámster	Muerte/ eutanasia	Campo oscuro		Cultivo		MAT	PCR
			Hígado	Riñón	Hígado	Riñón		
GspD +AIF	6	Muerte	+++	++	*	*	50	*
GspD +AIF	5	Muerte	++	+	*	*	400	*
GspD +AIF	1	Eutanasia	Sospechoso	-	*	*	800	*
GspD +AIF	2	Eutanasia	Sospechoso	+	*	*	800	*
GspD +AIF	3	Eutanasia	+	Sospechoso	-	-	100	-
GspD +AIF	4	Eutanasia	Sospechoso	Sospechoso	-	-	200	-
GspD +AIF	7	Eutanasia	Sospechoso	-	-	-	200	-
GspD +AIF	8	Eutanasia	+	+	-	-	200	*

AIF: Adyuvante incompleto de Freund

+: de 2 a 5 Leptospiras por campo

++: de 5 a 10 Leptospiras por campo

+++: >10 leptospiras por campo

\*: Positivo

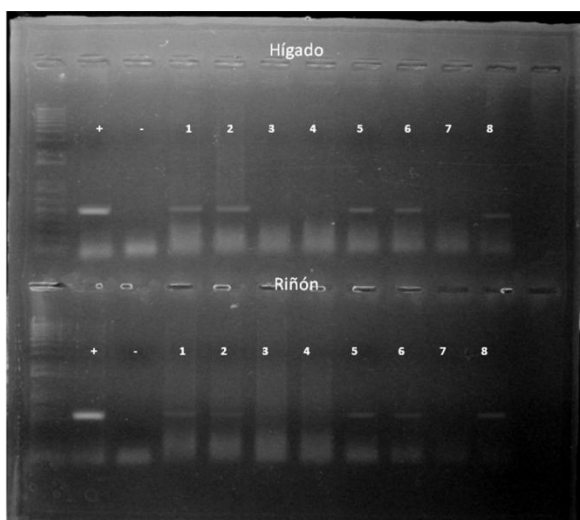


Figura 15.- PCR de hámsteres infectados con 400 *Leptospiras* de la cepa LOCaS46 que fueron utilizados durante el desafío. +: Control positivo de ADN de la cepa LOCaS 46, banda de ADN de 1749 bp. -: Control negativo, agua destilada, 1-8: Muestras de hígado y riñón de los hámsteres pertenecientes a este grupo.

#### 7.5.4 Grupo 4: Bacterina LOCaS 46 ( $10^9$ ufc/ml)

En los animales inmunizados y posteriormente desafiados, no se presentaron decesos, estos animales fueron eutanasiados a partir del día 35 post inoculación, a la necropsia no se encontraron cambios morfológicos aparentes.



Figura 16: Pulmón de un hámster tratado la bacterina LOCaS 46 mas adyuvante incompleto de Freund y desafiado con *L. interrogans* Canicola cepa LOCaS 46, hámster clínicamente sano sin lesiones macroscópicas aparentes

Los resultados del aislamiento, aglutinación microscópica y PCR se resumen en el siguiente cuadro.

Grupo	Hámster	Muerte/ eutanasia	Campo oscuro		Cultivo		MAT	PCR
			Hígado	Riñón	Hígado	Riñón		
Bacterina	1	Eutanasia	Negativo	Negativo	-	-	50	-
Bacterina	2	Eutanasia	Negativo	Negativo	-	-	25	-
Bacterina	3	Eutanasia	Negativo	Negativo	-	-	50	-
Bacterina	4	Eutanasia	Negativo	Negativo	*	*	400	*
Bacterina	1	Eutanasia	Negativo	Negativo	-	-	200	-
Bacterina	2	Eutanasia	Negativo	Negativo	-	-	25	-
Bacterina	3	Eutanasia	Negativo	Negativo	-	-	25	-
Bacterina	4	Eutanasia	Negativo	Negativo	-	-	100	-

+: de 2 a 5 Leptospiras por campo

++: de 5 a 10 Leptospiras por campo

+++: >10 leptospiras por campo

\*: Positivo

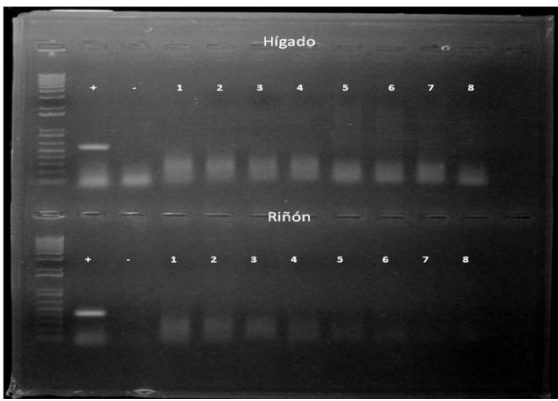


Figura 17.- PCR de hámsteres infectados con 400 *Leptospiras* de la cepa LOCaS46 que fueron utilizados durante el desafío. +: Control positivo de ADN de la cepa LOCaS 46, banda de ADN de 1749 bp. -: Control negativo, agua destilada, 1-8: Muestras de hígado y riñón de los hámsteres pertenecientes a este grupo.

## 7.6 Descripción macroscópica

Las lesiones pulmonares de cada hámster utilizado en este grupo mostraron diferentes grados de hemorragias sobre el parénquima, se utilizó la siguiente clasificación: sin lesiones (0%), leve (de 0 a 25%), moderado (de 25 a 50%), grave (de 50 a 75%) y masivo (de 75 a 100%) (Figura 18)

Los riñones pertenecientes a los animales de cada grupo presentaron congestión difusa, hemorragias, y al corte se observó pérdida de la relación entre la corteza y la médula.

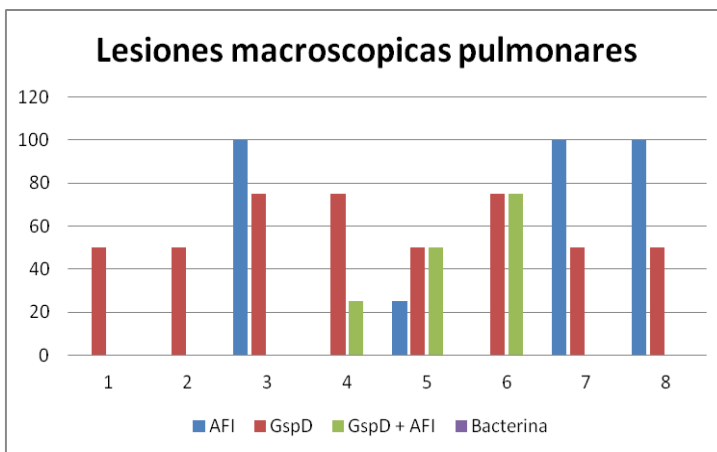


Figura 18: Porcentaje de lesiones macroscópicas pulmonares comparado entre los grupos inmunizados con el adyuvante, la proteína recombinante GspD, la proteína recombinante más el adyuvante y la bacterina, y posteriormente desafiados con *Leptospira interrogans* Canicola, cepa LOCaS 46

## 7.7 Descripción microscópica

Los fragmentos de riñón exhibieron grados variables de infiltrado inflamatorio, el cual estuvo compuesto principalmente por linfocitos, en algunas áreas se presentaron extensas áreas de congestión, degeneración vacuolar, nefritis intersticial y necrosis. (Figura 19)

Los resultados histopatológicos de los riñones de los hámsteres desafiados se resumen en el siguiente cuadro:

Número	Congestión	Hemorragia	Nefritis intersticial	Necrosis
Grupo 1: Testigo adyuvante				
1	+	+	+	+
2	+	+	-	-
3	++++	++	-	+
4	+	+	-	+
5	+	+	+	+
6	+	+	-	+
7	++++	++	+	+
8	++++	++	+	+
Grupo 2: GspD				
1	++++	++	-	+
2	+++	++	+	++
3	++++	++	+	+
4	++++	++	-	+
5	+++	+++	+	+
6	++++	++	-	+
7	+++	+++	+	+
8	++++	+++	+	+
Grupo 3: GspD mas adyuvante				
1	+	-	-	-
2	++	+	+	+
3	+++	+	-	+
4	++	+	-	-



5	+++	+++	+	+
6	++++	++++	+	+
7	++	+	-	-
8	+++	+	+	-
Grupo 4: Bacterina				
1	++	+	+	+
2	++	+	+	+
3	+++	+	-	+
4	+	+	+	+
5	++	-	-	-
6	+	-	-	-
7	+	+	-	+
8	++	+	-	-

+ Leve (25% de grado de lesión), ++ Moderado (25 al 50% de grado de lesión) +++ Grave (50 al 75% de grado de lesión) ++++ Masivo (75 al 100% de grado de lesión)

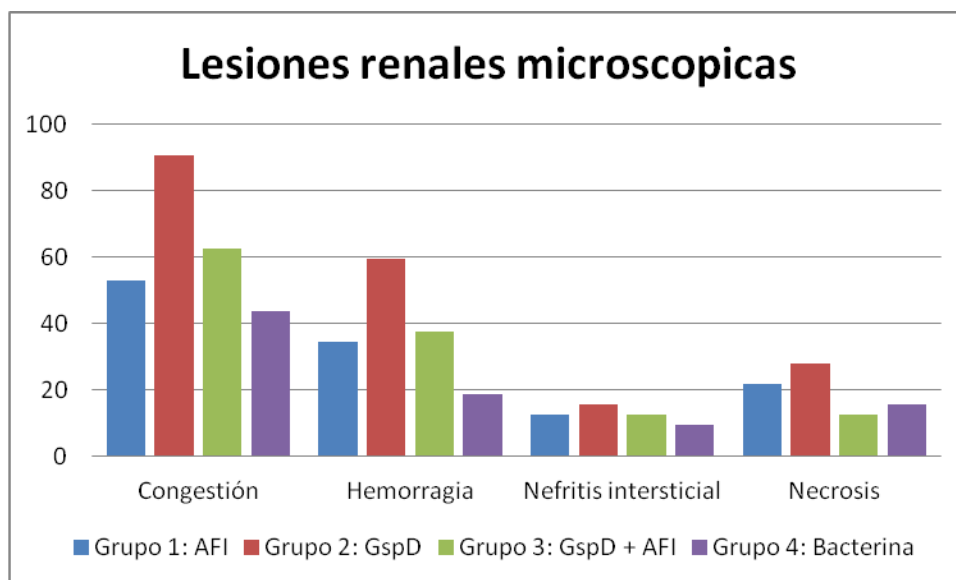


Figura 19: Porcentaje de lesiones macroscópicas pulmonares comparado entre los grupos inmunizados con el adyuvante, la proteína recombinante GspD, la proteína recombinante más el adyuvante y la bacterina, y posteriormente desafiados con *Leptospira interrogans* Canicola, cepa LOCaS 46

## 8. Discusión

En este trabajo no son concluyentes los resultados para determinar la protección generada por la proteína recombinante GspD, aunque se observó un 75% de supervivencia en el grupo inmunizado, donde en el 50% de los inmunizados no se aisló o detectó *Leptospira* por PCR, contrasta con el 62% de supervivencia del grupo testigo inmunizado con adyuvante.

Barnett (1999) y Hakee (2006) consideran que después de 4 semanas de edad, los hámsteres son más resistentes, se ha demostrado que puede incrementar la supervivencia en los desafíos aun con altas dosis de ciertas cepas, los animales que sobreviven al desafío pueden presentar una infección subletal con especial participación en los riñones (Barnett et al 1999, Hakee et al 1999). Esto coincide con este trabajo, ya que los animales utilizados tenían 8 semanas de edad al iniciar la inmunización y 12 semanas de edad al realizar el desafío.

En 2008, Rodríguez-Reyes realizó un ensayo piloto de protección de hámsteres, con la finalidad de determinar si existía alguna diferencia al desafío con la cepa virulenta LOCaS 46 de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola. Del grupo inmunizado con GspD de serovariedad Hardjo, obtuvo el 100% de supervivencia (n=3), en contraste con el grupo testigo, el cual solo obtuvo una supervivencia del 33% y los animales presentaron lesiones correspondientes a leptospirosis. El demostró que la proteína recombinante GspD evitó la muerte de los animales desafiados, así como la manifestación de la enfermedad, pero no pudo evitar la

infección de los animales, la cual se demostró por observación microscópica en campo oscuro y el aislamiento del microorganismo en riñón y orina.

La respuesta dominante contra la infección con leptospiras patógenas es la inmunidad humoral Th2, en la que se producen interleucinas responsables de una fuerte respuesta por anticuerpos e inhiben muchas de las funciones de los macrófagos, sin embargo la respuesta Th1 mediada por células también puede participar.

En este estudio utilizamos el adyuvante incompleto de Freund, con el objetivo de que al mezclarse con un antígeno pudiera aumentar significativamente su inmunogenicidad. Este actúa promoviendo la inflamación liberando lentamente el antígeno, favoreciendo la fagocitosis y la digestión enzimática de la molécula; de este modo amplifican la presentación y el reconocimiento de sus determinantes..

En 2009 Núñez Carrera realizó un estudio similar, utilizando GspD de *Leptospira borgpetersenii* (Hardjobovis) en hámsteres, obteniendo resultados similares; el grupo inmunizado con GspD obtuvo una supervivencia del 80%, mientras que la del grupo testigo no inmunizado fue del 60% , utilizando también como adyuvante el incompleto de Freund. Aunque se sospechó que el estudio falló por que el número de leptospiras de la cepa de desafío no fue homogéneo en todos los animales inoculados, ya que al realizarse el desafío a partir de medio semisólido Fletcher, el agar contenido en este medio podría haber capturado a las leptospiras y esto impedir un numero homogéneo de microorganismos para el desafío en los diferentes grupos de los animales, en contraste con este estudio, en el que el

inóculo se realizó a partir de medio líquido EMJH, garantizando las dosis homogéneas de leptospiras.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el adyuvante incompleto de Freund ayuda a mejorar la respuesta inmune frente a la infección por leptospirosis, ya que como se observó, el grupo que fue inmunizado solo con la proteína recombinante GspD presentó el 100% de mortalidad y el inmunizado solo con adyuvante mostró el 62% de supervivencia.

Con respecto a las lesiones macroscópicas, en los animales que sobrevivieron al desafío, lo primero que se observó al realizar la necropsia es que no se encontraron cambios morfológicos aparentes, sobre todo en pulmón, ni orina diluida, condiciones características en los animales que si 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 riñón, así como de la amplificación de productos de ADN de *Leptospira* con iniciadores específicos utilizados en la prueba de PCR.

Con respecto a la prueba MAT vemos que los animales pertenecientes al grupo inmunizado con GspD más adyuvante obtuvieron títulos más altos con respecto a los demás grupos inmunizados. Existen trabajos previos donde mencionan que títulos bajos o indetectables de anticuerpos en suero producidos por la vacunación son suficientes para conferir protección contra la enfermedad clínica y la muerte (Shenberg and Torten, 1973); por consiguiente, la ausencia de títulos de anticuerpos no necesariamente significa que el inmunógeno sea incapaz de

estimular el sistema inmune (Adler and Faine, 1977). Sin embargo, existen vacunas protectoras, tanto en animales como en humanos, que generan una respuesta de anticuerpos baja o indetectable según la prueba MAT, demostrando que la protección contra la enfermedad y muerte no está relacionada con títulos de anticuerpos altos (Faine *et al.*, 1999).

Las técnicas de ADN recombinante permiten la construcción de proteínas de fusión en las que se añaden etiquetas de afinidad específicas para la secuencia de interés; el uso de estas etiquetas de afinidad específica simplifica la purificación de las proteínas.

Para expresar y purificar una proteína recombinante existen distintos sistemas por los que podemos optar, básicamente se debe de elegir el huésped en el que se expresará la proteína, el vector de expresión y el sistema de purificación.

En particular *E. coli* es más usada universalmente por la facilidad de su manipulación genética, la sencillez y el bajo costo de su cultivo, así como la gran variedad de proteínas que se pueden obtener de cultivos líquidos de la bacteria. En general se utiliza como una fábrica celular y las proteínas recombinantes se recuperan desde el citoplasma de las células productoras.

Los vectores de expresión son moléculas de ADN que se auto replican en las células receptoras. Los plásmidos son elementos genéticos extracromosomales que se replican automáticamente. En este caso lo constituyen plásmidos que llevan genes de resistencia al antibiótico ampicilina.

En los sistemas de expresión pET la cepa de expresión contiene ADN del bacteriófago DE3 integrado en el cromosoma. Este bacteriófago contiene a su vez el gen codificante de la T7 RNA polimerasa, regulado por el promotor Lacuv5 cuya actividad se induce por medio de la adición de IPTG, la T7 RNA polimerasa expresada desde el cromosoma bacteriano induce la expresión de la proteína a partir del vector.

La adición de una etiqueta a la secuencia de la proteína, le otorga una afinidad obligatoria. La proteína recombinante etiquetada es generalmente la única proteína en la mezcla con esta afinidad, lo cual ayuda a la separación. La etiqueta que se utilizó en este estudio es de histidinas o polihistidinas, lo cual le otorga a la proteína afinidad hacia iones de níquel.

El establecimiento de modelos de enfermedad para resistencia y sustentabilidad a la enfermedad es importante en la investigación básica de leptospirosis (Faria-Tucunduva et al. 2007). La mayor parte de las publicaciones en leptospirosis experimental han sido enfocados en modelos para infecciones de tipo agudo en cuyos, hámsteres y ratones. El hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) es un buen modelo animal en el estudio de leptospirosis ya que tiene un importante número de ventajas: los signos clínicos y hallazgos patológicos en esta especie, son muy similares en la infección experimental a la infección natural (Olivia et al., 1994). Como se mencionó anteriormente, basándonos en que el hámster es un excelente modelo experimental, en este estudio innovamos una nueva ruta de inoculación, que se asemeja mas a la infección natural denominada vía sub

mucosa oral, o intraavazonal, ya que un número pequeño de *Leptospiras* puede penetrar tanto piel lesionada o mucosas, causando infecciones fatales (Faine, 1998), provocando la muerte de los animales a partir del día 9 post inoculación, presentando la misma semiología y lesiones que la vía intraperitoneal, utilizada en la gran mayoría de los estudios. La ventaja de esta ruta de infección es que es similar a una infección natural, debido que las leptospiras penetran en la mucosa.

Las vacunas de subunidades son una estrategia de intervención potencial contra la leptospirosis, que es un importante problema de salud pública en los países en desarrollo y una enfermedad en animales de granja y de compañía en el mundo.

Diversos grupos de investigación pretenden elaborar una vacuna eficaz aplicada a los animales reservorios que contribuya a evitar la enfermedad en los humanos. Las vacunas comerciales disponibles consisten en inactivar las leptospiras con calor o químicamente, protegiendo a los hámsteres de una infección letal. Las vacunas de células enteras solo producen inmunidad a corto plazo, lo que requiere de una administración dos veces al año, además son serovariedad específica contra la infección accidental.

La falta de protección cruzada, la necesidad de revacunación anual o bianual y una alta frecuencia de los efectos secundarios son grandes inconvenientes que han limitado la disponibilidad de células enteras de *Leptospira* como vacunas de uso humano. Se pretende que una vacuna de subunidad bien definida confiera protección cruzada e inmunidad a largo plazo, ayudando a la prevención de leptospirosis tanto en animales como en humanos.

Diversos investigadores han demostrado que las proteínas de membrana externa expuestas en la superficie de leptospiras patógenas llegan a potenciar una respuesta inmune protectora.

Matusunaga en 2007 proporcionó evidencia de que una sola proteína recombinante purificada es capaz de inducir inmunidad protectora contra la exposición letal en el modelo hámster.

Estudios previos utilizando proteínas recombinantes, incluyendo OmL1, LipL41 y LipL32, no demostraron inmunoprotección en hámsteres, aunque se ha demostrado que estas proteínas contienen epítopes inmunoprotectores utilizando otros enfoques.

Una formulación de vacuna a base de proteína recombinante ideal sería comprender un único fragmento que confiera inmunidad de protección cruzada hacia serotipos heterólogos.

En caso de la proteína recombinante GspD, los resultados iniciales presentados apoyan la necesidad de estudios de mayor tamaño utilizando un intervalo de concentraciones en conjunción con una variedad de adyuvantes. Por ejemplo se podrían duplicar las dosis de la proteína recombinante (100µl de proteína recombinante GspD), así como el tiempo de inmunización (3 inmunizaciones con 14 días de diferencia entre cada una).

También se sugiere probar el uso de otros adyuvantes, como hidróxido de aluminio, el cual crea un depósito del antígeno en los tejidos donde se inyecta,



liberándolo de forma lenta y generando una exposición prolongada del mismo. O una subunidad B de enterotoxina termolábil de E. coli (LBT), la cual demostró recientemente que al ser administrada junto con LipL32, podría proporcionar inmunidad protectora contra *Leptospira interrogans* serovariedad Copenhageni (Grassmann AA et al, 2012).

## 9. Conclusiones:

- El grupo inmunizado con la proteína GspD mas adyuvante tuvo una sobrevivencia del 75%, sin embargo hacen falta estudios posteriores ya que en el grupo testigo la mortalidad causada por la cepa no fue satisfactoria.
- En este ensayo se establecen los factores cruciales a considerar para realizar un ensayo posterior de protección con la proteína GspD
- Determinamos la dosis letal 50% (DL50) utilizando como vía de inoculación la vía intra avazonal o sub mucosa oral, como nueva alternativa de inoculación.

## 10. Literatura citada

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.

Alcaraz Sosa. Detección de la expresión de la secretina GspD, del sistema de secreción tipo II (T2S) de Leptospira mediante inmunohistoquímica (tesis de maestría en ciencias). México, D.F.: UNAM, 2008.

Alston JM, Broom JC. Leptospirosis in man and animals. Edinburgh and London 1958, E & S. Livingstone. 367

Amatredjo A, Campbell RSF. Bovine leptospirosis. Vet Bull 1975; 43: 875-891.

Pedro N Acha, Boris Szyfres. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales 3° EDICION. Ed. Organización panamericana de la salud 2001, Washington D.C.

Brooks GF, Botel JS, Morses A. Microbiología Medica Jawets. Melnick y Adelberg. 18ª edición. Mexico: El Manual Moderno, 2004; 332-336.

Castillo SLO. Detección de perros portadores de leptospiras patógenas: estudio bacteriológico, serológico y molecular (Tesis de Licenciatura) México: UNAM, 2008.

Castillo SLO, Ramirez OJM, Carmona GCA, De La Peña M A. 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.

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.

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 Borgpetersenni* subtype Hardjobovis. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 177: 319-326.

Dirección General de Epidemiología (DGE). Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de la Leptospirosis, Mexico; 2012.

Doern GV. Detection of Select Bacteria. *Clin Infect Dis* 200, 30; 166-173.

FAINE S. *Leptospira and Leptospirosis*. 2<sup>nd</sup> ed. Melbourne: MediSci, 1999.

Ellis Wa. Leptospirosis. *J Small animal practice* 1986; 27: 683-692

Grassmann AA, Felix SR, Ximendes Dos Santos C, Amaral MG, Seixas Neto AC, Fagundes MQ, Seixas FK, Da Silva EF, Conceicao FR, Dellagostin OA. 2012. Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled

or coadministered with the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Clin. Vaccine Immunol.* 19:740–745.

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.

Inada R, Ido Y, Hoki R, Ho H, Wani H. The serum treatment of weil's disease (*Spirochaetosi Icterohaemorrhagica*) *J Exp Med* 1916. Nov 1: 24(5): 485-496

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.

Levett Pn, Morey Re, Galloway Ri Steigerwalt AG. *Leptospira broomii* sp. Nov. isolated from humans with leptospirosis. *Int Syst Evol Microbiol* 2006; 56: 671-673.

Levett Pn. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; 14(2): 296-326.

Lemarroj VD, Carrillo VM. Leptospirosis y disfuncion organica multiple. Caso clínico y revision de literatura. *Revista de la asociación Mexicana de Medicina critica y terapia intensiva* 2003; 17: 176-183.

Lin X, Zhao J, Quian J, Mao Y, Pan J, Li L, Peng H, Luo Y, Yan J. Identificación of Immunodominant B- ad T- Cell Combined Epitopes in Outer Membrane Lipoproteins LipL32 and LipL21 of *Leptospira interrogans*. *Clinical Vaccine Immunology.* 2010; (17), 5: 778-783.

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: 149-174.

Mena Bañuelos R. Analisis in silico de los genes GspDL y GspEL del sistema de secreción tipo II de *Leptospira biflexa* serovariedad Patoc (tesis de maestria en Ciencias). México DF.: UNAM, 2006.

Nally Je, Whitelegge Jp, Bassilian S, Blanco Dr, Lovett M. Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. *Infect. Immun.* 2007; 75: 766-773.

Noguchi H, Kligert J. Immunological studies with a strain of *Leptospira* isolated from a case of yellow fever in Merida Yucatan. *J Exp Med* 1920; 32: 32-67

Organización Mundial De Sanidad Animal. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008. Paris, OIE, 2008. Capítulo 2.1.9. Leptospirosis.

Picaredau M, Bulach Dm, Bouchier C, Zuerner RI, 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.

Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ. *Veterinary microbiology and microbial disease*. England: Blackwell Science, 2002.

Rance BL. *Leptospirae*. In: Hirsh DC. Mc Lachalan NJ. Walker RL. *Veterynary Microbiology*. 2<sup>a</sup> ed. E. U. A. Blackwell Publishing, 2004; 185-188.

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

Rodriguez Reyes. Antigenicidad de la proteína de la membrana externa GspD, de la supuesta secretina del SST2S de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo (tesis de doctorado en ciencias). México DF.: UNAM, 2007.

Sadow K, Ramirez W, Leptospirosis. Revista electronic de veterinaria REDVET, 2005

Shang Es, Exner Mm, Summers Ta, Martinch 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.

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.

Terpstra WJ. International Leptospirosis Society, Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis. Surveillance and control. Malta: World Health Organization and the International Leptospirosis Society, 2003.

Variella G, Zavala J. Estudios serológicos de leptospirosis en la Republica Mexicana, *Rev Inst Salubr Enf Trop (Mex)* 1961; 1 y 2: 49-52

Waitkins S, Hookey Jv. Leptospirosis as an occupational disease. *Br J Ind Med* 1986; 20: 721-725.

## Apendice 1 Medios de cultivo y reactivos

### Medios de cultivo para *Leptospira*

**EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) adicionado con suero de conejo.**

#### Medio de cultivo liquido (500ml)

En 400 ml de agua destilada estéril se agregan y disuelven los siguientes ingredientes:

- Albumina sérica bovina fracción V 5g

Una vez disuelta se agrega lo siguiente:

- Fosfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 0.5g
- Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0.15g
- Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) 0.5g
- Piruvato de sodio ( $\text{CH}_2\text{COONa}$ ) 0.1g
- Acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) 0.5g

En 50 ml se agregan las siguientes soluciones:

- Cloruro de amonio (2.5g/10ml) 0.500ml
- Piruvato de sodio (1.0g/9ml) 0.500ml
- Glicerol al 10% (1ml/10ml)  
0.500ml
- Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) (0.15g/10ml) 0.350ml



- Sulfato de zinc ( $ZnSO_4$ ) (0.04g/10ml)  
0.500ml
- Sulfato de manganeso ( $MnSO_4$ ) (0.01g/10ml)  
0.500ml
- Tiamina HCl (0.5g/10ml) 0.500ml
- Cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) (0.15g/10ml)  
0.350ml
- Glicerol al 20% (2ml/8ml)  
0.250ml
- Cianocobalamina (Vitamina B12) (0.02g/10ml) 0.100ml
- Sulfato de cobre ( $CuSO_4$ ) (0.03g/10ml) 0.100ml
- Tween 80 0.625ml
- Sulfato ferroso ( $FeSO_4$ ) (0.03g/10ml)  
0.005g

Ya disueltas ambas soluciones se ajusta el pH, el cual debe de estar de 7.2 a 7.4, una vez ajustado se mezclan y agregan 40ml de suero de conejo previamente filtrado a  $22\mu m$ , se deja homogenizando 5 minutos, transcurrido el tiempo se filtra estérilmente y se embaza, se inactiva el medio en baño maría, a  $56^\circ C$  por 40 minutos, una vez transcurrido el tiempo se coloca en la estufa a  $37^\circ$  por 24 horas, para comprobar su esterilidad.

#### **Fletcher. Medio de cultivo semisólido (500ml)**

En 460ml de agua destilada se agrega lo siguiente:

- Extracto de carne 0.1g
- Bacto pectona 0.15g
- Cloruro de sodio (NaCl) 0.25g
- Agar agar 0.9g

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

Una vez a temperatura media, se agrega 40ml de suero de conejo previamente filtrado estérilmente a 22 $\mu$ m, se homogeniza y se envasa.

Una vez envasado, se inactiva el medio en baño maría, a 56°C por 40 minutos, una vez transcurrido el tiempo, se coloca en la estufa a 37°C por 24 horas, para comprobar su esterilidad.

### **Solución amortiguadora de fosfatos (SAF)**

Primero se preparan por separado las siguientes soluciones:

#### 1. Solución de Sorensen

- Fosfato disodico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 0.833g
- Fosfato monopotasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0.109g

Se disuelven en 100ml de agua destilada, se ajusta el pH a 7.6 y se esteriliza en autoclave.

#### 2. Solución salina fisiológica

- Cloruro de sodio (NaCl) 8.5g

Se disuelven en 100ml de agua destilada, se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza en autoclave.

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

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

#### **1.5 M Tris-HCL, pH 8.8**

- Tris base 54.45g
- Agua destilada 150ml

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 6.0g
- Agua destilada 50ml

Ajustar el pH a 6.8 con HCl

Aforar a 100ml y almacenar a 4°C

#### **SDS al 10%**

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

#### **Persulfato de amonio al 10%**

Disolver 25mg de Persulfato de amonio en 0.25ml de agua destilada.

Se prepara y utiliza al momento.

### **Preparación del gel separador al 12%**

- Agua destilada 3.35ml
- 30% acrilamida 4.0ml
- 1.5M Tris-HCl, pH8.8 2.5ml
- SDS al 10% 100µl
- Persulfato de amonio al 10% 50µl
- TEMED 5µl

Volumen total al momento 10ml

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 2 cristales, ensamblados en un aditamento de la cámara.

### **Preparación del gen concentrador al 4%**

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

Volumen total de monómero 5.05ml

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 2 cristales, ensamblados en un aditamento de la cámara.

### **Soluciones para electroforesis en geles de agarosa**

#### **Agarosa**

Disolver la cantidad de agarosa requerida (varía 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 3 ocasiones). La mezcla ya lista debe de quedar transparente y sin restos de agarosa en el fondo del matraz.

**Amortiguador de carga para electroforesis de ADN bacteriano**

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