

CARACTERIZACIÓN DE DETERMINANTES ANTIGÉNICOS CON REACTIVIDAD
CRUZADA ENTRE ESPECIES PATÓGENAS (P1) E INTERMEDIAS (P2) DEL GÉNERO
Leptospira DE LA COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS CON INTERÉS EN SALUD
ANIMAL (CMISA) DEL BANCO DE MICROORGANISMOS DE AGROSAVIA

NATALIA ISABEL DELGADO FORERO

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
FACULTAD DE CIENCIAS
BOGOTÁ D.C., COLOMBIA
2021

CARACTERIZACIÓN DE DETERMINANTES ANTIGÉNICOS CON REACTIVIDAD
CRUZADA ENTRE ESPECIES PATÓGENAS (P1) E INTERMEDIAS (P2) DEL GÉNERO
Leptospira DE LA COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS CON INTERÉS EN SALUD
ANIMAL (CMISA) DEL BANCO DE MICROORGANISMOS DE AGROSAVIA

NATALIA ISABEL DELGADO FORERO

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
Magister en Ciencias Básicas Biomédicas

DIRECTORA:

MARIA CAMILA RENJIFO IBÁÑEZ

Bióloga, PhD Medicina Tropical

GRUPO DE INVESTIGACIÓN:

Bioprospección de Biomoléculas y Microorganismos con Aplicaciones Agropecuarias

UNIVERSIDAD EL BOSQUE

FACULTAD DE CIENCIAS

BOGOTÁ D.C., COLOMBIA

2021



UNIVERSIDAD **EL BOSQUE**

Por una cultura de la vida, su calidad y su sentido

• • •

Acta de calificación y aprobación de trabajo de grado

Los suscritos Directores de la División de Postgrados y el Programa académico, con base en los criterios científicos, metodológicos y éticos que se han establecido para tal efecto y después de haber oído el concepto de los respectivos evaluadores asignados para calificar el trabajo de grado:

“Caracterización de determinantes antigénicos con reactividad cruzada entre especies patógenas (P1) e intermedias (P2) del género Leptospira de la colección de microorganismos con interés en salud animal (CMISA) del Banco de Microorganismos de Agrosavia”

Presentado como requisito parcial por la estudiante:

Natalia Isabel Delgado Forero

Para optar al título de:

Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas

Deciden asignar la calificación final de:

MERITORIA

Firmado en Bogotá D.C., el 26 de julio de 2021

Firmado electrónicamente
Juan Carlos Sánchez P.
Director
División de Postgrados

Firmado electrónicamente
Jaime E. Castellanos Parra
Director Programa

Firmado electrónicamente
Maria Camila Renjifo
Director de tesis

Firmado electrónicamente
Adriana María Pedraza
Jurado

Nota de Salvedad de responsabilidad institucional: " La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, sólo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia".

DEDICATORIA

A mi mamá por su apoyo, ejemplo y confianza.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – Agrosavia por la financiación de la totalidad del proyecto, así como la disposición de sus instalaciones y recursos en el Centro de Investigación Tibaitata para el desarrollo de cada una de las actividades.

A mi Directora de Tesis la Dra. Maria Camila Renjifo Ibañez y a todo el grupo de investigación que hace parte de la Colección de Microorganismos con Interés en Salud Animal de Agrosavia por su apoyo y enseñanzas dentro y fuera del laboratorio.

A la Universidad el Bosque por brindarme la oportunidad de seguir formándome profesionalmente.

A los maestros que a lo largo del proceso me ofrecieron sus conocimientos.

RESUMEN

Leptospira es un género de bacterias que se encuentra distribuido a nivel mundial. Teniendo en cuenta las relaciones filogenéticas de los microorganismos pertenecientes a este género, se clasifican en cuatro subclados: P1 - patógenas, P2 – intermedias, S1 y S2 - saprófitas, siendo los dos primeros los más relevantes en la salud humana y animal. El control de la leptospirosis, enfermedad causada por estas bacterias, es de gran importancia a nivel económico especialmente en los bovinos, en los que se manifiesta con problemas reproductivos. Existen vacunas que incluyen suspensiones de bacterias inactivas, que han sido muy poco efectivas, generando inmunidad únicamente frente a los lipopolisacáridos de los serovares incluidos en la vacuna. Es por esta razón que en el presente proyecto se confirmó la identificación taxonómica de los subclados de 55 aislamientos de *Leptospira*, que se encuentran en la colección de microorganismos con interés en salud animal (CMISA) del Banco de Microorganismos de Agrosavia, utilizando una región del gen *rrs*. Fueron obtenidas proteínas leptospirales solubles, no solubles y secretadas, para establecer cuáles podrían presentar reactividad cruzada para los subclados P1 y P2, por medio de pruebas de ELISA y Western Blot. Se evidenciaron bandas de proteínas secretadas de entre 60 y 74,5 KDa, con punto isoeléctrico entre 5 y 5,4, identificadas posteriormente como Enolasa, Factor de Iniciación de la Traducción 2 y Factor de Elongación Tu. Estas proteínas detectadas de pueden representar una alternativa como candidato vacunal contra cepas intermedias y patógenas, no dependiente de serovar y que permita inmunización de bovinos a largo plazo como método de prevención de la leptospirosis.

Palabras clave: *Leptospira*, P1 – patógenas, P2 – intermedias, proteínas leptospirales, reactividad cruzada.

ABSTRACT

Leptospira is a genus of bacteria that is distributed worldwide. Considering the phylogenetic relationships of the microorganisms belonging to this genus, they are classified into four subclades: P1 - pathogenic, P2 - intermediate, S1, and S2 - saprophytes, the first two being the most relevant in human and animal health. The control of leptospirosis, a disease caused by these bacteria, is so important especially in cattle, where it manifests with reproductive problems. There are vaccines that include inactive bacteria suspensions, which have been very ineffective, generating immunity only against the lipopolysaccharides of the serovars included in the vaccine. It is for this reason the present project confirmed the taxonomic identification of the subclades of 55 *Leptospira* isolates, which are found in the Collection of Microorganisms with Animal Health Interest of the Agrosavia Microorganisms Bank, using a region of the gen *rrs*. Soluble, not soluble and secreted leptospiral proteins were obtained to establish which could present cross reactivity for the P1 and P2 subclades, by means of ELISA and Western Blot tests. Was evidenced a secreted protein band between 60 and 74.5 KDa, with an isoelectric point between 5 and 5.4, identified later as Enolase, Translation Initiation Factor 2 and Elongation Factor Tu. This experimentally detected protein may represent an alternative as a vaccine candidate that is not serovar dependent and that allows long-term immunization of bovines as a method of preventing leptospirosis.

Keywords: *Leptospira*, P1 - pathogens, P2 - intermediates, soluble and not soluble leptospiral proteins, cross reactivity.

CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	13
2.	MARCO TEORICO	15
2.1.	Agente etiológico: <i>Leptospira</i> spp.	15
2.1.1.	Taxonomía del género <i>Leptospira</i>	15
2.1.2.	Características morfológicas, fisiológicas y genéticas del género <i>Leptospira</i> 17	
2.1.3.	Patogenicidad y evasión de la respuesta inmune del hésped	18
2.2.	Leptospirosis	19
2.2.1.	Cuadro clínico y diagnóstico	19
2.2.2.	Epidemiología de la Leptospirosis	20
2.2.3.	Leptospirosis en Colombia.....	21
2.3.	Vacunas frente a <i>Leptospira</i>	23
2.3.1.	Vacunas tradicionales.....	23
2.3.2.	Reactividad cruzada	24
2.3.3.	Vacunas recombinantes experimentales frente a Leptospirosis.....	25
2.3.4.	Vaccinología inversa.....	26
2.4.	Proteínas Leptospirales	27
2.4.1.	Proteoma leptospiral.....	27
2.4.2.	Secretoma leptospiral	29
3.	OBJETIVOS.....	32
2.5.	Objetivo principal	32
2.6.	Objetivos específicos.....	32
3.	METODOLOGIA	33
3.1.	Aislamientos de <i>Leptospira</i> spp.	33
3.2.	Extracción de ADN	33

3.3.	Amplificación de una región conservada del gen 16S <i>ADNr</i>	34
3.4.	Construcción de un árbol filogenético	34
3.5.	Obtención de proteínas secretadas	35
3.6.	Obtención de proteínas de bacteria completa.....	35
3.7.	Obtención de sueros de animales infectados.....	36
3.9.	Electroforesis unidimensional (SDS-PAGE) y bidimensional (2-DE)	38
3.10.	Pruebas de ELISA indirecta	39
3.11.	Western Blot	40
3.12.	Identificación de proteínas inmunoreactivas.....	40
4.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	41
4.1.	Clasificación taxonómica de los aislamientos de la CMISA.....	41
4.2.	Obtención de proteínas a partir de aislamientos y cepas de referencia de <i>Leptospira</i> de la CMISA	44
4.3.	Anticuerpos vacunales y de infección	49
4.4.	Inmunoensayos	51
4.5.	Identificación de proteínas inmunoreactivas	60
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	62
	BIBLIOGRAFIA.....	64
	ANEXOS.....	81

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Prevalencias reportadas para serovares de <i>Leptospira</i> en Colombia.....	22
Tabla 2. Aislamientos de CMISA seleccionados para los inmunoensayos.....	43
Tabla 3. Cepas de referencia seleccionadas en el estudio.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Filogenia del género <i>Leptospira</i>	16
Figura 2. Obtención de tres fracciones de proteínas leptospirales.....	36
Figura 3. Amplificación de una región del gen <i>rrs</i> en los 55 aislamientos de <i>Leptospira</i> spp. que hacen parte de la CMISA.....	41
Figura 4. Árbol filogenético construido a partir de una región del gen <i>rrs</i> de los 55 aislamientos de <i>Leptospira</i> spp. que hacen parte de la CMISA.....	42
Figura 5. Gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie, con proteínas de bacteria completa no solubles de aislamientos y cepas de referencia de <i>Leptospira</i> spp. de la CMISA.....	45
Figura 6. Geles de 2-DE teñidos con azul de Coomassie, con proteínas de bacteria completa no solubles, de dos aislamientos (Lep 032 – P1 y Lep 051 – P2).....	46
Figura 7. Gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie, con proteínas de bacteria completa solubles de aislamientos y cepas de referencia de <i>Leptospira</i> spp. de la CMISA.....	47
Figura 8. Gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie, con proteínas secretadas de aislamientos y cepas de referencia de <i>Leptospira</i> spp. de la CMISA.....	49
Figura 9. Geles de 2-DE teñidos con azul de Coomassie, con proteínas secretadas de dos aislamientos (Lep 032 – P1 y Lep 051 – P2).....	50
Figura 10. Gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie, con inmunoglobulinas precipitadas con Sulfato de amonio y Ácido caprilico, a partir de sueros bovinos	50
Figura 11. Curvas de titulación de pruebas de ELISA controles negativos.....	51
Figura 12. Títulos de anticuerpos obtenidos por ELISA para las proteínas de cepas de referencia enfrentadas a sueros murinos inmunizados con vacunas comerciales o inmunoglobulinas purificadas a partir de sueros bovinos	53
Figura 13. Títulos de anticuerpos obtenidos por ELISA para las proteínas de aislamientos P1 y P2 de la CMISA enfrentadas a sueros murinos inmunizados con vacunas comerciales.....	54

Figura 14. Títulos de anticuerpos obtenidos por ELISA para las proteínas de aislamientos P1 y P2 de la CMISA enfrentadas a inmunoglobulinas purificadas a partir de sueros bovinos.....	55
Figura 15. Análisis por Western blot de la reactividad de proteínas de bacteria completa no solubles de aislamientos de la CMISA.....	56
Figura 16. Análisis por Western blot de la reactividad de proteínas secretadas de aislamientos de la CMISA.....	58

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Aislamientos pertenecientes a la CMISA.....	81
Anexo 2. Información de las vacunas usadas en la inmunización de ratones.....	82
Anexo 3. Resultados datos crudos espectrofotometría de masas.....	83

1. INTRODUCCIÓN

Leptospira es un género bacteriano dividido en dos grandes linajes evolutivos, P y S, que a su vez se dividen en cuatro subclados P1 (patógenas), P2 (intermedias o de patogenicidad moderada), S1 y S2 (saprófitas o no patógenas) dentro de los cuales se han identificado más de 300 serovares (Vincent et al., 2019). Los microorganismos pertenecientes a los subclados P1 y P2 son responsables de la leptospirosis, una enfermedad zoonótica que se encuentra distribuida a nivel mundial (Guglielmini et al., 2019). Debido al incremento poblacional, problemas sanitarios y condiciones climáticas, las regiones tropicales y subtropicales son más propensas a la presencia de la misma (Builes-Jaramillo & Arias-Monsalve, 2019). En Colombia, la leptospirosis en humanos es de notificación obligatoria para el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila), pero no lo es para animales como bovinos, en los cuales se han registrado prevalencias de especies P1 de entre 17 y 60.9% (Carreño et al., 2017; Pérez-García et al., 2019; Vecol S.A., 2018a, 2018b). Para especies P2 no se tienen datos de prevalencias, sin embargo, existen reportes de aislamientos en bovinos (Cassalett et al., 2016), perros y humanos (Romero-Vivas et al., 2013).

La leptospirosis en bovinos representa grandes pérdidas económicas, ya que es una de las enfermedades infecciosas asociadas a problemas reproductivos en la ganadería bovina, produciendo abortos, mortinatos, partos prematuros, terneros débiles y de bajo peso al nacer (Anderson, 2007; Benavides et al., 2010; Ellis, 2015; Romero et al., 1999). Para la prevención de esta enfermedad, hace más de 100 años se encuentran disponibles vacunas a partir de bacteria completa o bacterinas, las cuales generan inmunidad corta de tipo T-independiente por medio de los lipopolisacáridos de membrana característicos de la especie. Las vacunas disponibles se fabrican contra serovares patógenos y su efectividad está altamente restringida a los serovares contenidos en la preparación (Grassmann et al., 2017; Vernel-Pauillac & Werts, 2018).

Varias investigaciones se han centrado en la interacción de estas bacterias con sus hospederos, las cuales han permitido identificar gran cantidad de proteínas localizadas en la superficie de la bacteria o que son secretadas por esta, que pueden presentar un gran potencial como inmunógenos (Grassmann et al., 2017). Algunas de las proteínas más estudiadas, como LenA, LipL32 y Lsa26, entre otras, se encuentran mediando la unión del

microorganismo a componentes de la matriz extracelular (ECM), permitiendo su diseminación. (Fernandes et al., 2016; Fraga et al., 2014). Por otro lado, se han reportado proteínas secretadas que actúan como proteasas que permiten la evasión de la respuesta inmune innata, clivando moléculas centrales en la respuesta inmune innata, como lo es la proteína del complemento C3 (Fraga et al., 2014, 2016).

Los retos de las vacunas leptospirales actuales son múltiples. Es de alta importancia en el país que el diseño de vacunas que confieran inmunidad frente a especies prevalentes, tanto P1 como P2 y que puedan inducir una respuesta inmune a largo plazo, evitando así la transmisión de la enfermedad. Para tal fin, la colección de *Leptospira* spp. del Banco de microorganismos de Agrosavia, representa una fuente de estudio importante de la diversidad del género en Colombia. La colección cuenta actualmente con 55 aislamientos de diversas partes del país y orígenes animales y ambientales, pertenecientes a los dos clados (P y S), identificados con anterioridad por el grupo de investigación por medio del gen *rpoB*, así como una evaluación preliminar en cuanto a presencia de factores de virulencia de estos. Sin embargo, teniendo en cuenta la complejidad para la clasificación taxonómica del género, se hizo prioritario robustecer la identificación de los aislamientos por medio de la caracterización del gen *rrs*, con el fin de garantizar la identidad del material biológico perteneciente a la colección. Una vez se tuvieron identificados los subclados, se obtuvieron diferentes fracciones de proteínas leptospirales de algunos aislamientos P1 y P2, para ser sometidos a posterior evaluación de su inmunogenicidad por medio de pruebas de ELISA y western blot, con el fin de identificar proteínas que presenten reactividad cruzada para especies P1 y P2, que puedan usarse como potenciales candidatos vacunales en estudios posteriores.

2. MARCO TEORICO

2.1. Agente etiológico: *Leptospira* spp.

2.1.1. Taxonomía del género *Leptospira*

El primer aislamiento de una *Leptospira* fue realizado en 1907, a partir de secciones de un tejido de riñón de un paciente que fue descrito como fallecido por fiebre amarilla, microorganismo que para ese tiempo fue llamado *Spirocheta interrogans*. El nombre de *Leptospira* para el género, fue propuesto para el año 1918, para diferenciar la espiroqueta causante de la enfermedad de Weil, de otras espiroquetas (Adler, 2015a). Actualmente *Leptospira* es un género de microorganismos perteneciente al dominio de las Bacterias, phylum Spirochaetes, del orden de las Leptospirales, dentro de la familia Leptospiraceae (Levett, 2015).

El género *Leptospira* reportó para el año 2018 un total de 35 especies y para el 2019 un total de 65 especies, la mayoría de estas ambientales. Considerado un género en expansión, gracias a las diferentes técnicas de la era de la genómica se han utilizado en los últimos años para su estudio (Abdullah et al., 2021; Caimi & Ruybal, 2020; Thibeaux et al., 2018; Vincent et al., 2019). De acuerdo con características filogenéticas y patogénicas el género se puede clasificar en dos grandes clados P y S, divididos en 4 subclados P1 (tradicionalmente descritas como patógenas), P2 (tradicionalmente descritas como intermedias), S1 (tradicionalmente descritas como saprófitas) y S2 (grupo descrito en el 2019 que también incluye especies saprófitas) (Figura 1) (Vincent et al., 2019). Las especies que se encuentran dentro del subclado P2, consideradas intermedias, comparten un ancestro común con las especies patógenas (P1), por lo cual comparten algunos factores de virulencia y exhiben patogenicidad moderada en animales y humanos (Picardeau, 2017).

serovares del género *Leptospira* por CAAT, se han implementado diferentes metodologías alternativas, como Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT) (Smythe et al., 2009), Reacción en Cadena Polimerasa (PCR) (Bezerra et al., 2011), Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) (Jung et al., 2015), Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) (C. M. Romero-Vivas et al., 2013), Espectrometría de Masas MALDI-TOF (MALDI-TOF MS) (Calderaro et al., 2014), Análisis Multi-locus de Número Variable de Repeticiones en Tándem (MLVA) (Pavan et al., 2011), Tipificación Multi-locus de Secuencias (MLST) (Guglielmini et al., 2019), entre otros, sin lograr una reproductibilidad del 100% en comparación con la prueba gold standard.

Tradicionalmente la clasificación de bacterias se lleva a cabo por medio de características fenotípicas como la tinción de Gram, requerimientos en medios de cultivo y test bioquímicos. Sin embargo, debido a la baja diversidad fenotípica dentro del género *Leptospira*, estas técnicas no son aplicables para la identificación a nivel de especie. Pruebas como la virulencia en modelos animales, crecimiento en diferentes temperaturas y en presencia de un análogo de la purina 8-azaguanina, pueden ser usados para separar los clados P y S (Vincent et al., 2019). La clasificación de aislamientos de *Leptospira* se suele realizar a nivel filogenético, para su separación en subclados, por medio de genes housekeeping incluyendo *rrs*, *rpoB* y *gyrB*, que permiten también la identificación de la mayoría de las especies (Morey et al., 2006; Scola et al., 2006; Slack et al., 2006).

2.1.2. Características morfológicas, fisiológicas y genéticas del género *Leptospira*

Las bacterias pertenecientes al género *Leptospira* son largas, delgadas, altamente móviles y de forma espiral, características que son fácilmente observables por microscopía de campo oscuro (Cameron, 2015). Presentan diámetros aproximados de 0.15 μm y una longitud de entre 10 y 20 μm (Picardeau, 2017). La morfología de *Leptospira* difiere de otras espiroquetas por la presencia de terminaciones en forma de gancho en ambos polos (Mohammed et al., 2011).

A nivel genotípico *Leptospira* presenta un cromosoma circular largo de entre 3.500 y 4.300 Kb, con una densidad de genes de entre 75 y 92 % y un cromosoma pequeño de 300 a 350 Kb (Picardeau, 2015). Se ha identificado que Leptospiras S1 como *L. biflexa*, tiene más genes que codifican a respuestas ambientales y proteínas metabólicas, cuando

se compara con especies P1, evidenciando su capacidad de sobrevivir a nivel ambiental (Picardeau et al., 2008). A nivel genético las *Leptospiras* pertenecientes al subclado P1 y P2, son mucho más parecidas cuando se comparan con todo el clado S. Por ejemplo *L. licerasiae*, perteneciente a P2, comparte 2.237 genes con *L. interrogans* perteneciente a P1, 2.077 genes con *L. borgpetersenii*, también perteneciente a P1, y 1.898 genes con *L. biflexa*, perteneciente a S1 (Ricaldi et al., 2012).

2.1.3. Patogenicidad y evasión de la respuesta inmune del huésped

Leptospira spp. penetra en la piel a través de heridas o laceraciones y pueden migrar rápidamente a través de la dermis. Una vez superan la barrera endotelial de los vasos sanguíneos y son diseminadas por medio de la sangre, llegan a órganos blanco como los riñones para establecer infección (Picardeau, 2017). Después de obtener la entrada al hospedero, los lipopolisacáridos (LPS) y lipoproteínas de *Leptospira* interactúan con los Receptores tipo Toll (TLR) 4 y 2 expresados por las células presentadoras de antígenos (CPA), como macrófagos y células dendríticas, lo cual conduce a la inducción de la respuesta inmune innata y a la inflamación (Werts, 2018). Éstos microorganismos también interactúan con los TLR4 de las células B a través de los LPS, conduciendo a la activación y proliferación de las células B y a la producción de IgM anti LPS. De igual manera, pueden activar células $T\gamma\delta$ presentes en la piel y membranas mucosas para la posterior secreción de IFN γ (Faisal et al., 2012).

Se conoce que las especies P1 de *Leptospira* presentan diversas estrategias que le permiten ser eficaz en las diferentes etapas de la infección (Picardeau, 2017). Algunas de estas estrategias se encuentran centradas en la evasión del sistema inmune como: 1). Escape del sistema de complemento por medio de la unión de algunas de sus proteínas de membrana, LigA y LigB, a moléculas del sistema de complemento, como el factor H, C3b y C4b; 2). Adquisición de proteasas del hospedero, como el plasminogeno, a través de la unión a proteínas de membrana externa como Lsa23, que le permite escindir C3b, C4b y C5, promoviendo una regulación negativa del sistema de complemento; 3). Inactivación directa de proteínas de complemento por proteasas endógenas de *Leptospira*, como metaloproteasas de la familia de las termilisinas, las cuales son capaces de escindir e inactivar proteínas de complemento como C3, Factor B, C2 y C4; 4). Después de la fagocitosis por células del sistema inmune como macrófagos o células

dendríticas, *Leptospira* escapa de la fusión del fagosoma – lisosoma y permanece en el citosol, esperando condiciones favorables para inducir la apoptosis, a través de la activación de las caspasas 8, 3 y 6; 5). Las Leptospiras pueden presentar variaciones en el antígeno O de los lipopolisacáridos, lo cual impide su reconocimiento por TLR4, permitiendo su diseminación. Por último, 6). *Leptospira* spp presenta una expresión diferencial de proteínas de membrana, teniendo en cuenta condiciones ambientales y especies, lo cual facilita la colonización y persistencia en órganos blanco (Faisal et al., 2012; Fraga et al., 2016). Vale la pena aclarar que la supervivencia de las Leptospiras en el curso de la infección y la presencia de cada uno de los mecanismos de evasión del sistema inmune, dependen directamente del hospedero y serovar de *Leptospira* infectante (Werts, 2018).

Algunos factores de virulencia son compartidos entre especies P1 y P2 del género, como la expresión de la proteína de membrana LipL32, la cual se ha evidenciado que se une individualmente a componentes de la laminina I y V, componentes de la ECM (Fernandes et al., 2016). La leptospirosis causada por especies P2 no es clara y está poco documentada (Balamurugan et al., 2013; Picardeau, 2017), a pesar de que se ha encontrado alta prevalencia tanto en humanos como animales (Chiriboga et al., 2015).

2.2. Leptospirosis

2.2.1. Cuadro clínico y diagnóstico

La leptospirosis, enfermedad causada por bacterias del género *Leptospira*, fue descrita por primera vez en humanos, por el médico Adolph Weil en 1886, como un tipo de ictericia, que presentaba esplenomegalia, disfunción renal, conjuntivitis y erupciones en la piel, que en conjunto se nombraría más tarde como Enfermedad de Weil (Adler, 2015a).

En animales *Leptospira* spp. han sido aisladas de peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Jobbins & Alexander, 2015; Mgode et al., 2014; Petrakovsky et al., 2014; Picardeau, 2017). La susceptibilidad de los animales tanto domésticos como silvestres frente a *Leptospira* spp. puede ser muy variada, ya que mientras bovinos o caballos pueden ser afectados por una gran cantidad de especies y serovares, animales como los ratones y murciélagos son reservorios naturales de la enfermedad y son considerados

como resistentes a la misma (Boey et al., 2019; Ellis, 2015; Mateus et al., 2019). Signos y síntomas como la fiebre, ictericia y sensibilidad muscular, entre otros, se observan tanto en animales como en humanos. Sin embargo, las infecciones crónicas en animales también pueden desencadenar en importantes pérdidas económicas, debido a los problemas reproductivos que ocasiona (Ellis, 2015). En los sistemas de producción bovina, por ejemplo, la leptospirosis causa problemas reproductivos como abortos, mortinatos, partos prematuros, terneros débiles y de peso reducido al nacer, infertilidad, mastitis, disminución en la producción de leche e incluso la muerte (Ellis, 2015; Fávero et al., 2018; Grassmann et al., 2017).

Teniendo en cuenta que los signos y síntomas de la enfermedad en los primeros estadios, no son específicos, es importante hacer el diagnóstico diferencial frente a otras enfermedades como *Neospora*, Fiebre Q y Diarrea viral bovina (DVB), para bovinos (Ellis, 2015; Pérez-García et al., 2019). La prueba estándar para el diagnóstico de la leptospirosis es la aglutinación microscópica (MAT), en la cual el suero del paciente es incubado con un panel de cultivos de diferentes serovares de *Leptospira*, evidenciando positividad cuando se observa aglutinación a nivel microscópico (OIE, 2018). Adicionalmente, se tienen diferentes alternativas de diagnóstico serológicas como pruebas de ELISA, microbiológicas como el aislamiento del microorganismo y detección del mismo por medio de microscopía de campo oscuro, y moleculares como PCR, usando genes housekeeping del género como *rrs*, *gyrB* o *secY*, o genes de patogenicidad como *lipL32*, *lig* o *lfb1* (Ellis & Little, 1986; Ellis, 2015; Haake & Levett, 2015; OIE, 2018).

2.2.2. Epidemiología de la Leptospirosis

La leptospirosis es considerada la zoonosis bacteriana más común a nivel mundial, reportando casos en todos los continentes (Torgerson et al., 2015). Los animales y humanos pueden ser clasificados como hospederos de mantenimiento (actúa como reservorio del microorganismo en el ecosistema muchas veces sin padecer la enfermedad) o accidentales (presentan signos y síntomas clínicos), teniendo en cuenta el serovar causante de la infección. Los hospederos de mantenimiento más importantes son mamíferos pequeños, los cuales pueden transferir la infección a animales domésticos de granja, perros y humanos (Levett, 2001). Las *Leptospiras* P1 se encuentran ampliamente diseminadas en la naturaleza, ya que se pueden mantener en su hospedero de

mantenimiento colonizando los túbulos renales proximales y se excretan a través de la orina hacia el medio ambiente, donde pueden sobrevivir por tiempos prolongados en ambientes húmedos (Builes-Jaramillo & Arias-Monsalve, 2019; Picardeau, 2017). La entrada más común del microorganismo al hospedero accidental se da por medio de contacto directo de abrasiones y cortes en la piel, o vía tejido conjuntivo, con agua o suelo contaminado con la orina (Haake & Levett, 2015).

Para humanos se reportan más de un millón de casos severos a nivel mundial y 60.000 muertes por año, más que todo en países tropicales (Guglielmini et al., 2019). Sin embargo, esto se considera un subregistro, ya que la leptospirosis se presenta como un síndrome febril no específico, que es clínicamente difícil de distinguir de otras infecciones, por lo cual muchas veces no es correctamente diagnosticado (Guglielmini et al., 2019; Torgerson et al., 2015). Los estimados de morbilidad y mortalidad de leptospirosis más altos han sido registrados en regiones del sur y sureste asiático, Oceanía, regiones Caribe, Andina y Central de América Latina y el este de África Sub-Sahariana (Costa et al., 2015). Los casos reportados en países desarrollados se relacionan más que todo a condiciones de vida precarias o actividades recreativas que incluyan el contacto con el agua (Bandara et al., 2014; Bharti et al., 2003).

2.2.3. Leptospirosis en Colombia

En Colombia se ha reportado presencia de leptospirosis en humanos, caninos, bovinos, porcinos, primates y roedores (Carreño et al., 2017; Mateus et al., 2019; Pérez-García et al., 2019). Específicamente en bovinos, al igual que a nivel mundial, representa una problemática en la economía de las ganaderías del país y en las barreras no arancelarias al comercio. En Colombia no se tienen datos específicos frente a pérdidas económicas, mientras que a nivel mundial se han reportado cifras de pérdidas por abortos bovinos de US\$1.500, US\$ 2.333 y €2.369, derivados del mantenimiento de animales, costos en personal y tratamientos médicos en países como Estados Unidos, Argentina y Francia, respectivamente (Ayrál, 2013; Draghi et al., 2011; Lee & Kim, 2007). No obstante, resulta difícil estimar las pérdidas económicas causadas exclusivamente por la leptospirosis, teniendo en cuenta aspectos como la dificultad en su diagnóstico y a la presencia de otras enfermedades infecciosas que causan sintomatología similar (Bellows et al., 2002; Ellis & Little, 1986).

La prevalencia de leptospirosis es heterogénea entre países y regiones. Para Colombia se ha demostrado que afecta tanto a ganado de carne como lechero. En diferentes departamentos reportan prevalencias de leptospirosis bovina que van desde 17 % hasta 60,9 % (Carreño et al., 2017; Vecol S.A., 2018b, 2018a). Estos estudios se han aproximado a la clasificación de serovares por medio de la técnica MAT, reportando prevalencias de diferentes serovares, que pueden variar de una región a otra, tal como se evidencia en la tabla 1 El boletín sanitario anual del ICA del 2016 (ICA, 2019) reporta una incidencia de leptospirosis de 12%, en donde la población en riesgo supera los 13.000 animales, en diferentes predios de los departamentos de Antioquia, Casanare, Caquetá y Meta, a pesar de la vacunación de los animales. Al no ser incluidas en MAT, no se ha determinado a la fecha la prevalencia de las especies P2 , a pesar de tener datos sobre aislamientos en humanos, bovinos y otros animales (Betancur et al., 2013; Cassalet et al., 2016; Romero-Vivas et al., 2013; Zuluaga, 2009). Dadas estas cifras se evidencia la relevancia de mejorar la eficiencia y eficacia de las vacunas, buscando alternativas a las bacterinas.

Tabla 1. Prevalencias reportadas para serovares de *Leptospira* en Colombia.

Serovar	Pereira (Zuluaga, 2009)	Montería (Betancur et al., 2013)	Antioquia, Cundinamarca, Boyacá y Nariño (Vecol S.A., 2018b)	Montería y Cundinamarca (Vecol S.A., 2018a)
Tarassovi	-	-	5%	4,8%
Pomona	6,8%	10,43%	3,8%	7,4%
Grippotyphosa	18,9%	29,85%	3%	4,6%
Hardjo prajitmo	45,7%	20,8%	3%	7,2%
Copenhageni	-	-	1,9%	5,8%
Bratislava	5%	-	1,9%	4,1%
Celledoni	-	-	1,9%	2,4%
Canicola	14,5%	7,4%	1,7%	5,6%
Cynopteri	-	-	1,1%	0,2%

Mini	-	-	0,8%	0,5%
Shermani	-	-	0,1%	0,7%
Bataviae	-	-	0,1%	0,3%
Autumnalis	-	-	-	0,3%
Icterohaemorrhagiae	9,1%	16,41%	-	-

2.3. Vacunas frente a *Leptospira*

2.3.1. Vacunas tradicionales

Las vacunas para la prevención de la leptospirosis han estado disponibles desde 1917, elaboradas a partir de bacterias inactivadas con ácido carbónico (bacterinas), las cuales aparecieron en el mercado un año después del primer aislamiento del microorganismo (Adler, 2015a). Desde la elaboración de la primera vacuna y hasta la actualidad se siguen utilizando bacterinas para la inmunización de animales de granja, perros y humanos, y a pesar de que no genera el 100% de protección sigue siendo la el único tipo de vacuna licenciado en la actualidad (Adler, 2015b; Grassmann et al., 2017; Orozco Vega et al., 2005; E. C. Sánchez et al., 2007; Sonada et al., 2018). Se ha evidenciado la disminución de la incidencia de leptospirosis con las vacunas tradicionales, con inmunizaciones repetidas de vacunas multivalentes, que contengan los serovares prevalentes en determinada región geográfica (Vernel-Pauillac & Werts, 2018). Para Colombia algunas de las vacunas comercializadas son: Bovisan® LEPTO 8 – Virbac, Bovisan® Total – Virbac, Bovilis Vista 5 L5 SQ - MSD Salud Animal, Nobivac® Lepto - MSD Salud Animal, Blindagán® - Blindagán® - Vecol y Cattlemaster® GOLD FP 5 L5 – Zoetis. En estas preparaciones se incluyen entre 2 y 8 serovares en cada una, dentro de los que se encuentran Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Tarassovi, Bratislava y Wolffi, sin encontrar correspondencia con todos los serovares reportados como prevalentes en diferentes regiones del país (Tabla1).

Las bacterinas leptospirales generalmente se encuentran formuladas dentro de vacunas reproductivas que contienen otros microorganismos inactivados, las cuales incluyen los serovares patógenos más comunes en el mundo (Pomona, Hardjo, Canicola, Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae). La formulación actual de las vacunas reproductivas no incluye, en ninguna de sus presentaciones, serovares de especies P2.

Estas vacunas, sin embargo, tienen varios inconvenientes: I) confieren inmunidad únicamente a corto plazo, II) generan protección solo contra los serovares contenidos en la preparación y III) no previenen la transmisión de la enfermedad (Balamurugan et al., 2013; Fernandes et al., 2017; Romero-Vivas et al., 2013). Los inconvenientes que presentan las vacunas actuales son derivados del tipo de antígeno usado para generar inmunidad, que al ser bacterinas, son principalmente los lipopolisacáridos de membrana externa (ref). Las variaciones en las cadenas laterales de los carbohidratos de los LPS leptospirales son los responsables de la variabilidad antigénica que se observa a través de serovares (ref). Como resultado de la inmunodominancia de los LPS, las vacunas leptospirales que consisten en bacterinas inducen anticuerpos principalmente contra carbohidratos, lo cual induce una protección de tipo timo-independientes, induciendo la síntesis de IgM por células B, sin la participación de las células T ayudadoras (Cruse et al., 2004). En consecuencia, las vacunas utilizadas actualmente a menudo no proporcionan protección cruzada contra los serovares que no fueron contenidos en la vacuna (Guerreiro et al., 2001; Odir et al., 2011). De igual manera, se ha demostrado que los LPS de especies P2 son diferentes a nivel estructural, frente a los que presentan las especies P1, por lo cual, al no ser incluidas dentro de las bacterinas, no se está generando inmunidad frente a especies de éste subclado (Patra et al., 2015).

2.3.2. Reactividad cruzada

La restricción a los serovares de cada vacuna, es una consideración muy importante debido a la gran diversidad del género. Frente a este tema se ha demostrado que serovares como Canicola, en bacterinas, proveen de protección homóloga del 100% y heteróloga del 100% frente a serovares como Ballum y Copenhageni, pero muy variable frente a Mozdok e Icterohaemorrhagiae (Rosario et al., 2012; Sonrier et al., 2001). En el uso de una vacuna atenuada del serovar Manilae, serogrupo Pyrogenes, esta presenta protección del 70 al 100% frente a serovares como Pomona, Grippotyphosa, Canicola, Autumnalis y Australis (Murray et al., 2018). Cuando se comprueba el efecto de preparaciones de bacterinas bivalentes, se ha evidenciado disminución de efectos en el organismo como la hepatitis y la falla renal, de 57.8 a 46.5% y de 51.7 a 21.6%, respectivamente, incluyendo cuando se retan los organismos de prueba a grupos heterólogos (André-Fontaine & Triger, 2018).

Para evidenciar reactividad cruzada, también se ha probado la inmunización por medio de cepas vivas, como la M1352, que es una *Leptospira interrogans* serovar Manilae, que ha sido reportada por tener un transposon mutante que altera la expresión de LPS. Al inmunizar hamsters con este candidato potencial para vacuna viva, evidenciaron una protección del 100%, cuando fueron retados de manera heteróloga frente al serovar Pomona (Srikram et al., 2011). En otro estudio se realizó la inmunización de hamsters con *Leptospiras* inactivadas por calor y/o formaldehído, y una posterior extracción de LPS con butanol. Encontraron una supervivencia del 100% cuando se inmunizaban con cepas del serovar Canicola y retadas con el serovar Copenhageni, sin embargo, cuando se realizaba la inmunización y el reto con los serovares opuestos la supervivencia podía bajar hasta 20% (Lauretti-Ferreira et al., 2020). Se ha comprobado también el efecto protector de lipopolisacáridos provenientes de especies S1 como *L. biflexa*, sin embargo, hasta en dosis altas hay presencia de *Leptospiras* P1 en cultivos derivados de la corteza renal (Matsuo et al., 2000). A pesar de que se han obtenido respuestas significativas, en ensayos de reactividad cruzada, la mayoría de estos se limitan a unos cuantos serovares y en ninguno de estos se encuentra evidencia de ensayos con especies pertenecientes al subclado P2 (Grassmann et al., 2017; Maneewatch et al., 2008).

2.3.3. Vacunas recombinantes experimentales frente a Leptospirosis

Con la información obtenida sobre los perfiles proteicos de *Leptospira* spp. han sido diseñadas diversas vacunas recombinantes experimentales, ninguna disponible en el mercado. Un ejemplo de este tipo de vacunas tienen como componentes principales dos proteínas de membrana externa (OMPs): OmpL1 y LipL41, que fueron usados en conjunto y experimentalmente se obtuvo una protección en un tercio de los experimentos (Haake et al., 1999). Un segundo ejemplo son Lp14154, Lp1118 y Lp0607, proteínas de membrana externa que fueron probadas experimentalmente por separado, fallando en proveer a los organismos protección frente a la enfermedad. Sin embargo, juntas en una vacuna recombinante y encapsuladas en liposomas, confirieron protección de un 75% (Faisal et al., 2009). Un último ejemplo son las proteínas leptospirales de tipo inmunoglobulina o proteínas Lig, las cuales se encuentran bastante conservadas en las cepas P1 y son considerados candidatos vacunales importantes. En un experimento, usando una quimera recombinante conteniendo fragmentos de las proteínas LigA y LigB, fueron inmunizados hamsters para luego ser retados con la cepa de referencia *Leptospira interrogans* serovar

Copenhageni strain Fiocruz L1-130, obteniendo una protección del 100% (da Cunha et al., 2019).

Una estrategia adicional que ha sido probada para la inmunización frente a leptospirosis, son las vacunas de ADN, que al igual que las recombinantes anteriormente nombradas, usan información obtenida en diversos estudios, frente a las proteínas de *Leptospira* spp. El gen que codifica para la proteína 1 asociada a hemólisis (Ham1), fue utilizado para la inmunización de jerbos, para luego ser retados frente a *Leptospira interrogans* serovar Canicola, obteniendo una protección del 60% (Branger et al., 2005). En otro estudio, usando como vector una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, hamsters fueron inmunizados con el gen que codifica para la proteína LipL32, para luego ser retados con la cepa de referencia *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130, evidenciando protección del 60% (Seixas et al., 2007).

2.3.4. Vaccinología inversa

Resultados obtenidos en diferentes diseños experimentales, han impulsado la búsqueda de nuevos candidatos vacunales en los proteomas de *Leptospira* spp. por medio de vacunología inversa, impulso que se dio a partir de las primeras dos secuenciaciones de genoma completo de *L. interrogans* serogroupo Icterohaemorrhagiae serovares Lai y Copenhageni realizadas en 2003 y 2004 (Dellagostin et al., 2017). Por medio de esta metodología estudios como el de Murray et al. (2013), permitieron la evaluación de 238 proteínas candidatas para vacunas. De igual manera el estudio realizado por De Alvarenga et al. (2015) en el cual identifican 12 candidatos vacunales a partir de estudios *in silico* de proteínas secretadas del género, candidatos de los cuales no se encuentran antecedentes de estudios experimentales.

La predicción *in silico*, por medio de herramientas de inmunoinformática, ha permitido evidenciar diferencias significativas entre cepas de los cuatro subclados, así como secuencias de proteínas muy conservadas entre cada uno de los clados (Dhandapani, Sikha, Rana, et al., 2018). Este tipo de herramientas también ha permitido la predicción de proteínas inmunogénicas, predicción de epítopes de las células B y T, predicción de alérgenos, selección de epítopes conservados a través de las especies o serovares,

interacciones de unión con moléculas HLA y análisis de la estabilidad de la interacción (Lata et al., 2018, 2020).

2.4. Proteínas Leptospirales

2.4.1. Proteoma leptospiral

Diversos estudios realizados alrededor del proteoma de representantes del género *Leptospira*, han permitido llevar a cabo caracterizaciones funcionales y estructurales, estableciendo relaciones entre proteínas y procesos biológicos específicos, que ayudan a entender la manera en que este género lleva a cabo su patogénesis (Nascimento et al., 2018). La mayoría de los proteomas de *Leptospira* han sido caracterizados gracias a técnicas básicas como electroforesis 2DE para la separación de proteínas y MALDI TOF, Cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC/MS), para la identificación de las mismas (Nascimento et al., 2018; Thongboonkerd, 2008).

Se ha encontrado para *Leptospira* que la cantidad de proteínas y sus isoformas, pueden variar ampliamente teniendo en cuenta la exposición a antibióticos, cambios en la temperatura, limitación de hierro en el ambiente y/o presencia de suero (Picardeau, 2015; Schmidt et al., 2011). De igual forma, pueden variar de una especie a otra o de un serovar a otro. *Leptospira biflexa* serovar Patoc (saprofita) difiere significativamente con los perfiles de proteínas de *Leptospira interrogans* serovares Australis, Bratislava, Autumnalis e Icterohaemorrhagiae (patógenos), con 129 spots de proteínas diferentes, entre las que se encuentra por ejemplo la proteína chaperona para el plegamiento de proteínas GroEI, expresada en dos isoformas en las cepas P1, mientras no se encuentra presente en la cepa no patógena (Thongboonkerd et al., 2009). Al interior de la especie *Leptospira interrogans* se pueden encontrar grandes diferencias en los reportes de cuantificación de proteínas entre los serovares Copenhageni, Pomona, Lai y Canicola, que pueden ir desde 108 hasta 2673 proteínas (Humphryes et al., 2014).

A nivel de función y localización celular, la mayor cantidad de estudios se ha realizado en diferentes serovares de *Leptospira interrogans*, evidenciando la necesidad de proteomas completos de especies del clado S y el subclado P2 (Nascimento et al., 2018). Para el serovar Pomona, el mayor porcentaje de proteínas (31%) son reportadas como

hipotéticas, seguidas por componentes de la membrana que cumplen funciones como transporte (13%) y proteínas de metabolismo (12%); las proteínas restantes en menor porcentaje cumplen procesos celulares como energía y metabolismo del carbono, patogenicidad, virulencia y adaptación, biosíntesis de moléculas, degradación, ente otras (Vieira et al., 2009). Para los serovares Canicola, Copenhageni y Pomona, la mayoría de las proteínas se localizan en el citoplasma, seguidas por la membrana, independientemente de su función (Humphryes et al., 2014).

La mayoría de los estudios sobre el proteoma del género, se han centrado en OMPs, teniendo en cuenta su exposición al medio extracelular, en la búsqueda de proteínas que permitan el reconocimiento del patógeno por parte del sistema inmune de su hospedero (Nascimento et al., 2018). En esta búsqueda se han encontrado gran cantidad de proteínas inmunoreactivas que se encuentran conservadas en dos o más serovares: como LipL41, LipL32, fructosa-bisfosfato aldolasa, factor Ts de elongación, flagelina, entre muchas otras (González et al., 2003; Humphryes et al., 2014; Sakolvaree et al., 2007; Thongboonkerd, 2008; Zeng et al., 2015). Se ha demostrado igualmente que las OMPs tienen una amplia respuesta tanto para IgG como para IgM, mientras que las proteínas citoplasmáticas presentaron baja representación en ambas, lo que indica que este tipo de proteínas podría usarse tanto para diagnóstico (infecciones activas IgM) como para vacunación (memoria inmune a largo plazo IgG) (Lessa-Aquino et al., 2015).

Las OMPs son agrupadas tradicionalmente en tres grupos, que son lipoproteínas, proteínas transmembranales y proteínas de membrana periférica (Raja & Natarajaseenivasan, 2015). Para las especies *Leptospira interrogans*, *Leptospira borgpetersenii* y *Leptospira biflexa* se han reportado 133, 130 y 144 OMPs (Dhandapani, Sikha, Rana, et al., 2018). Algunas de las proteínas mayormente reportadas son LipL32, una lipoproteína de 32 KDa que ha sido identificada como la más abundante en la membrana externa de *Leptospiras* P1, con aproximadamente 38.000 copias por célula y ha sido ampliamente usada como marcador molecular para este grupo y para algunas especies P2 donde está presente; OmpL1 es una proteína transmembranal que está presente en la membrana externa en pequeñas cantidades, en comparación con otras lipoproteínas; LipL41 que es una lipoproteína altamente conservada en *Leptospira* spp.; LipL21 es la segunda lipoproteína más abundante en el proteoma de *L. interrogans* serovar Lai y su secuencia se encuentra conservada en las *Leptospiras* P1; LenA es una

lipoproteína transmembranal con una porción extracelular en el N-terminal, que ha sido estudiada por su unión al factor H del sistema de complemento; y por último Lig A, Lig B y Lig C que son proteínas leptospirales de tipo inmunoglobulina bastante conservadas en cepas P1, con identidades que van del 66 al 99% (Cullen et al., 2002; Haake & Zuckert, 2014; Picardeau, 2015; Pinne & Haake, 2009; Silveira et al., 2017). Todas estas proteínas usadas por *Leptospiras* en su patogénesis, han sido evaluadas para diagnóstico y vacunas con efectos variables (Raja & Natarajaseenivasan, 2015).

2.4.2. Secretoma leptospiral

Se ha evidenciado que las proteínas extracelulares juegan un papel primordial en la patogenicidad de diversas especies de bacterias, incluidas las pertenecientes al género *Leptospira* (L. Zeng et al., 2013). Los primeros estudios de proteínas secretadas para este género identificaron hemolisinas, la mayoría de estas clasificadas como esfingomielinasas, conservadas en serovares patógenos como Pomona, Lai e Icterohaemorrhagiae (Bernheimerl & Bey, 1986; Ren et al., 2003; Zhang et al., 2005). Las secuenciaciones genómicas realizadas han anotado 5 genes que codifican esfingomielinasas en *L. interrogans*. Sin embargo, solo dos de estos, que codifican para las proteínas SphA y Sph2 poseen los residuos de aminoácidos que son necesarios para conformar el sitio catalítico, proteínas que se han evidenciado sobre expresadas en diferentes modelos de infección animal (Narayanavari et al., 2012). Para Sph2 ha demostrado una alta actividad citotóxica frente a células de mamíferos como linfocitos y macrófagos de ratón BALB/C, así como en células de hígado humano L-02 (Zhang et al., 2008). Por otro lado se han evidenciado hemolisinas no esfingomielinasas, como SphH, cuyo peso molecular es 64 KDa, de las cuales se ha demostrado que su virulencia es debida principalmente a la formación de poros en las membranas celulares de las células de mamíferos, específicamente eritrocitos (Lee et al., 2002). Para un análisis *in silico* realizado en *L. interrogans* serovar Lai, fueron reportadas, adicional a SphH, otros 5 genes que codifican hemolisinas no esfingomielinasas: LA0327 (31,6 KDa), LA0378 (44,6 KDa), LA1650 (36,5 KDa), LA3937 (50,4 KDa) y LA0177 (8,6 KDa) (Zhang et al., 2005).

El secretoma de *Leptospira* juega también un papel importante en la evasión del sistema inmune de sus hospederos, con la secreción de diversas proteasas que inactivan directamente el sistema de complemento. Una de estas es la termolisina codificada por el

gen LIC13322, identificada como una metaloproteasa de 74 KDa, que se ha evidenciado cliva la molécula central del sistema de complemento C3 y otra molécula corriente abajo que es C6 (Amamura et al., 2017; Fraga et al., 2014). Sin embargo, se ha demostrado que las proteasas leptospirales son capaces de actuar sobre un amplio rango de sustratos, incluyendo el Factor B de la vía alternativa del complemento y C2 y C4 de las vías clásica y de lectinas (Fraga et al., 2016). Se ha podido demostrar que la degradación de proteínas del sistema de complemento es llevada a cabo más que todo por metaloproteasas, teniendo en cuenta que su actividad es prácticamente abolida en presencia de 1,10 – fenantrolina (Amamura et al., 2017; Fraga et al., 2016). De igual manera han sido reportadas proteínas *Moonlighting* (proteínas multifuncionales), como la enolasa y el factor de elongación Tu (EF-Tu), que además de cumplir funciones citoplasmáticas, interactúan con componentes de la ECM y componentes del sistema de complemento, facilitando la invasión de tejidos e invasión durante la infección (Salazar & Barbosa, 2017).

Por medio de técnicas como cromatografía líquida con espectrofotometría de masas se han identificado 104 proteasas, 53 de éstas contienen péptidos señal que les permiten ser secretadas por el sistema clásico de secreción y 19 por sistemas no clásicos, que incluyen tipos catalíticos de metalo-, serin-, cistein-, treonin- y asparagin- peptidasas (Dhandapani et al., 2018). Se ha evaluado la actividad proteolítica de proteasas secretadas por *L. interrogans* serovar Kennewicki cepa Fromm, frente a un amplio panel de componentes de la ECM y proteínas plasmáticas, evidenciando la degradación de fibrinógeno, fibronectina plasmática, gelatina y los proteoglicanos decorina, biglicano y lumicano humanos (da Silva et al., 2018). Adicional a esto técnicas como la zimografía han permitido evidenciar proteinasas capaces de degradar diferentes tipos de sustancias proteicas como gelatina, caseína y albumina, que son estables inclusive a altas temperaturas y que oscilan pesos moleculares entre 240 y 32 KDa (Lata et al., 2018; Madanan & Mechoor, 2017; Madathiparambil et al., 2011).

Por otro lado, se han encontrado más de 66 proteínas en el secretoma de *L. interrogans* serovar Lai, 33 de éstas que se predijeron extracelulares *in silico*, traslocadas al medio extracelular por sistemas de secreción tipo I y tipo II (Zeng et al., 2013). Para diferentes especies y serovares han sido identificadas proteínas como enolasas, que son secretadas extracelularmente y se unen al plasminógeno humano (Nogueira et al., 2013), una

metaloproteinasas putativa llamada Leptallo I, que se ha demostrado presenta actividad elastinolítica y ha sido reconocida en sueros de humanos infectados, lo que evidencia que es expresada durante el proceso infeccioso (Hashimoto et al., 2013), la proteína ColA, presente en *L. interrogans* serovar Lai, expresada y secretada durante la infección, la cual tiene alta afinidad por el colágeno tipo III (Kassegne et al., 2014), la metalopeptidasa Lep-MP1/2/3 que degrada componentes de la ECM y se determinó su papel primordial como factor de virulencia en la etapa de invasión al hospedero (Ge et al., 2020) o la proteína GroEL, sobre expresada en la formación de biofilm por *Leptospira in vitro* (Kumar et al., 2017).

Aun no existe amplia evidencia de la efectividad de proteínas secretadas del género *Leptospira* como posibles inmunógenos o herramientas de diagnóstico. La proteína Leptallo I (41 KDa), con actividad elastinolítica, fue utilizada para la inmunización de hámsters confiriendo una protección del 33% cuando fueron retados a *L. interrogans* serovar Copenhageni cepa Fiocruz LI-130 (Hashimoto et al., 2013). De igual manera, fue probada la eficiencia de diagnóstico de leptospirosis por medio de pruebas de ELISA usando la proteína fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (LA_1375), de 50 KDa, la cual se encuentra ampliamente conservada en diferentes especies y serovares patógenos, y demostró una sensibilidad de 100% y especificidad de 95,65%, en correlación con MAT (Samaha, 2019).

3. OBJETIVOS

2.5. Objetivo principal

Determinar la reactividad cruzada entre proteínas secretadas para especies patógenas (P1) e intermedias (P2) del género *Leptospira* de la colección de microorganismos con interés en salud animal (CMISA) del Banco de Microorganismos de Agrosavia.

2.6. Objetivos específicos

- Confirmar la identificación taxonómica de los aislamientos patógenos (P1), intermedios (P2) y saprófitos (S1 y S2) que hacen parte de la Colección de Microorganismos con Interés en Salud Animal (CMISA) por medio de la amplificación de una región del gen *rrs*.
- Identificar proteínas antigénicas con potencial reactividad cruzada para su uso en el desarrollo de metodologías de prevención y diagnóstico.

3. METODOLOGIA

3.1. Aislamientos de *Leptospira* spp.

Este estudio incluye 55 aislamientos (Anexo1) y 6 cepas de referencia de *Leptospira* spp., que se encuentran en La Colección de Microorganismos de Interés en Salud Animal – CMISA de Agrosavia. Estos aislamientos presentan diferentes orígenes biológicos (Bovino, porcino, humano, canino, roedor y agua) y son cultivados en medio EMJH (Ellinghausen, McCullough, Johnson y Harris) líquido para los diferentes estudios moleculares que se realizaron a corto plazo (Turner, 1970). 1ml de cultivo es inoculado en 7ml de EMJH líquido estéril e incubado en agitación a 110 r.p.m. a 30 °C durante cuatro a cinco días. Se realiza seguimiento al cultivo por medio de observación en fresco en microscopio de campo oscuro verificando la viabilidad y abundancia de los microorganismos. Una vez logrado crecimiento abundante, se siembran aproximadamente 500 µl del cultivo en caldo BHI, durante 24 horas a 37 °C, para evidenciar la pureza del mismo.

3.2. Extracción de ADN

Se realizó extracción de ADN de los 55 aislamientos de *Leptospira* por el método de fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico. Inicialmente los concentrados celulares de los aislamientos de *Leptospira* fueron suspendidos en 0,56 ml de buffer TE pH 8.0 (Tris 1 M/EDTA 10 mM) y agitados con vórtex. Posteriormente, se agregaron 5 µl de proteinasa K (20 mgml⁻¹), 2µl de RNAsa (100 mgml⁻¹) y 30 µl de SDS 10% (m/v); e incubadas por 1 hora a 65°C. Terminada la incubación, se adicionaron 0,1 ml de NaCl 5 M y 80 µl de CTAB 10% en NaCl 0,7 M (m/v), agitados con vórtex e incubados por 30 minutos a 65 °C. Después del tiempo de incubación, se adicionaron 0,8 ml de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (25:24:1), se mezclaron por inversión y centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos. Al sobrenadante obtenido, se adicionaron 0,7 ml de Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24:1) y llevados a centrifugación a 14.000 rpm por cinco minutos. Posteriormente, se realizó precipitación del ADN con isopropanol frío y etanol al 70 % (v / v). El ADN obtenido fue suspendido en 50 µl de agua ultra pura estéril y se almacenaron - 20°C. El ADN fue cuantificado con Nano Drop 2000 y se prepararon diluciones de trabajo de cada una de las muestras en concentraciones de 25 ng/µl.

3.3. Amplificación de una región conservada del gen 16S *ADNr*

Para la amplificación de una región del gen 16S *ADNr* se utilizaron los iniciadores A/B (A forward GGCGGCGCGTCTTAAACATG – B reverse TTCCCCCATTGAGCAAGATT) para amplificar una región de 331 pb del *rrs*, diseñados por Merien (1992). Las condiciones de amplificación fueron denaturación inicial a 94°C por 3 minutos, 29 ciclos con denaturación a 94°C por 1 minuto, anillamiento a 57°C por 1:30 minutos, elongación a 72°C por 2 minutos, elongación final 72°C por 10 minutos y conservación final a 4°C. Los productos amplificados fueron visualizados en gel de agarosa al 1,2% [m/v], teñido con Syber-Safe® al 1,5% [v/v], en campo eléctrico de 60 V, durante 60 minutos. Los productos de amplificación fueron secuenciados por el método Sanger, como servicio externo con la empresa CorpoGen, para la realización de un análisis filogenético.

3.4. Construcción de un árbol filogenético

La calidad de las secuencias de una región de 331pb del gen *rrs*, en formato .AB1, fue evaluada con el programa SeqTrace 0.9 (Stucky, 2012) así como la obtención de secuencias consenso. Las secuencias fueron alineadas usando el método MUSCLE en el programa MEGA v.7 (Kumar et al., 2018). Finalmente, el archivo con el alineamiento fue utilizado para la reconstrucción filogenética usando el método de máxima verosimilitud (en base al modelo de Kimura 2 parámetros) con el test de filogenia de bootstrap con 1000 réplicas, permitiendo así la clasificación de los 55 aislamientos dentro de tres subclados. Se incluyeron las secuencias de *L. interrogans* serovar Bratislava cepa PigK151 (CP011410.1:1922112-1922414) para el subclado P1, *L. fainei* serovar Hurstbridge (AY996789.1:25-327) para el subclado P2, *L. biflexa* serovar. Patoc (Z98588.1:7-308) para el subclado S1 y *L. kobayashii* cepa CES (MN061033.1) para el subclado S2 como grupos internos y *Turneriella parva* DSM21527 (CP002959.1:2844792-2845099) como grupo externo.

A partir de la clasificación filogenética, se realizó la selección de 24 aislamientos (12 P1 – patógenos y 12 P2 – intermedios) para la obtención de proteínas y posteriores inmunoensayos.

3.5. Obtención de proteínas secretadas

Se realizó la obtención de sobrenadantes con proteínas secretadas de 24 aislamientos de *Leptospira* de CMISA (12 P1 - patógenos y 12 P2 – intermedios), así como a 6 cepas de referencia incluidas en vacunas comercializadas en el país, teniendo en cuenta la metodología descrita por Da Silva et al. (2018), con algunas modificaciones. Brevemente, se pusieron a crecer las cepas de *Leptospira* spp. en 80 ml de EMJH durante 7 días en agitación a 110 rpm y 30°C, en condiciones aerobias, a una concentración inicial de 10% del microorganismo. Para la obtención de proteínas secretadas se colectó la masa celular por medio de centrifugación (3.200g por 15 minutos) y lavó dos veces con PBS pH 7,4. Las bacterias fueron resuspendidas en PBS pH 7,4 NaCl 120 mM, a una concentración bacteriana aproximada de 1×10^9 , establecida por escala McFarland, e incubadas a 37°C durante 4 horas. Los sobrenadantes fueron colectados por centrifugación (3.200g por 15 minutos), filtrados (0,22 μ m) y concentrados usando filtros de centrifuga Amicon® Ultra (3.000 NMWL, Merck Millipore). El pellet conteniendo la masa celular, fue conservado para experimentos posteriores (Figura 2). La conservación de las proteínas para los inmunoensayos se llevó a cabo por medio de liofilización de las mismas, bajo las siguientes condiciones: 24 horas de secado con una temperatura de -45°C y una presión al vacío no superior a 1hPa. Cada una de las bandejas del liofilizador estuvo programada para un aumento de temperatura progresivo de la siguiente forma: cinco horas a -35°C, cinco horas a -28°C, cinco horas a -10°C, cinco horas a 10°C y finalmente a 28°C. Los liofilos resultantes fueron almacenados a 4°C.

3.6. Obtención de proteínas de bacteria completa

Los pellets con masa celular producido en el protocolo para la obtención de proteínas secretadas, fueron utilizados para la obtención de proteínas solubles de bacteria completa según el protocolo propuesto por Dong et al. (2017) con algunas modificaciones. Las cepas leptospirales fueron resuspendidas en PBS para disrupción ultrasónica utilizando una potencia continua de 200 W (amplitud 60) durante 2 minutos en hielo. Los lisados se centrifugaron a 4000 g durante 15 min a 4°C para separar el pellet que contenía proteínas leptospirales no solubles (OMPs y LPS en su mayoría) y los sobrenadantes con proteínas solubles (citoplasmáticas en su mayoría) (Figura 2), para posteriormente ser conservados por liofilización, bajo las mismas condiciones aplicadas a las proteínas secretadas.

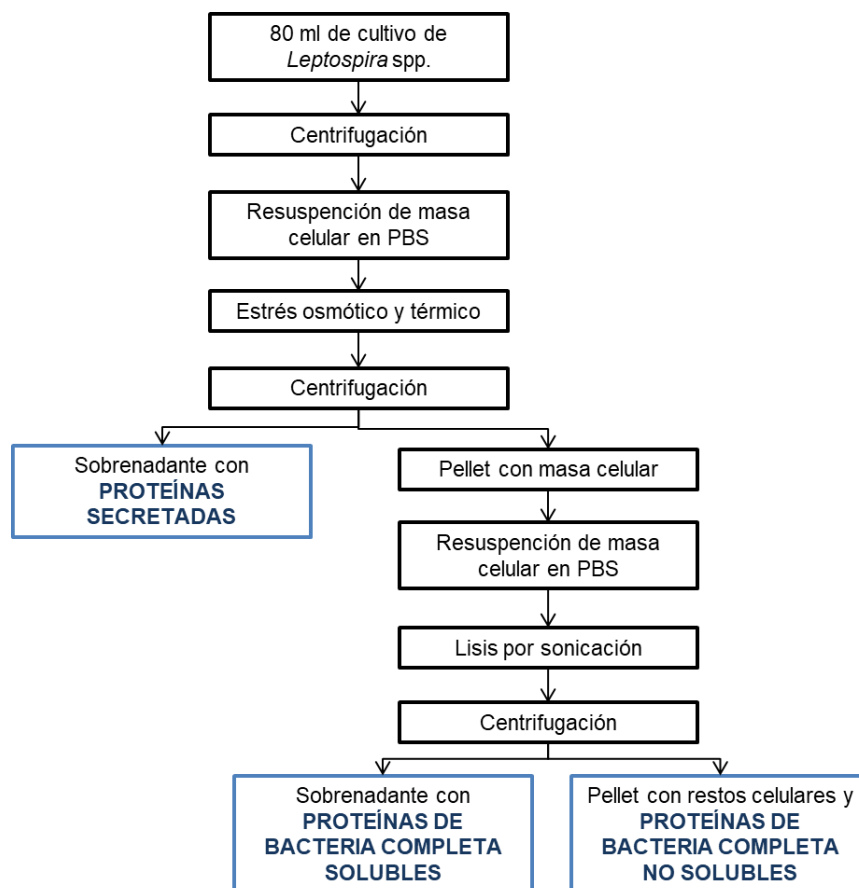


Figura 2. Obtención de tres fracciones de proteínas leptospirales.

3.7. Obtención de sueros de animales infectados

Para la caracterización de la inmunogenicidad de las diferentes fracciones de proteínas leptospirales, fueron obtenidos sueros bovinos positivos para leptospirosis o con signos y síntomas, para la obtención de anticuerpos producidos por enfermedad. Estos sueros fueron obtenidos por profesionales de Agrosavia del Centro de Investigación Motilonia, a partir de hembras y machos, vacunados frente a *Clostridium* sp. y aftosa. Los bovinos muestreados presentaron MAT positivo para *Leptospira* y Pruebas de ELISA positivas para *Neospora*, Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), Virus sincitial respiratorio (VSR), Leucosis viral bovina (LVB) y Diarrea viral bovina (DVB), y/o signos y síntomas como repetición de calores, abortos, piometra o metritis, que se correlacionan con leptospirosis. A partir de estos se realizó precipitación de inmunoglobulinas por dos métodos: Sulfato de amonio (Fishman & Berg, 2018) y Ácido caprílico (Page & Thorpe, 2002), con algunas

modificaciones. Para ambos protocolos se realizaron inicialmente pools de los sueros bovinos.

En el primer método, se adicionó sulfato de amonio sobre saturado gota a gota al pool de sueros bovinos, para una concentración final de 25% (m/v) y se dejó en agitación a 200 rpm durante la noche a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 10.000 g durante 30 minutos a 4°C, recuperando el sobrenadante. Se adicionó sulfato de amonio sobre saturado gota a gota, para una concentración final de 50% (m/v) y se dejó en agitación a 200 rpm durante la noche a 4°C. Finalmente se centrifugó a 10.000 g durante 30 minutos a 4°C, recuperando el pellet, el cual fue resuspendido en PBS pH 7.4, en relación 1:2, para posteriormente ser concentrados usando filtros de centrifuga Amicon® Ultra (3.000 NMWL, Merck Millipore) cuantificados y visualizados por medio de un perfil electroforético por SDS-PAGE.

Para el segundo método de purificación, al pool fue adicionado buffer 0,06 M acetato de sodio pH 4.6, en relación 1:1. Inmediatamente después se agregaron gota a gota, 1,7 ml de ácido caprílico por cada 25 ml de muestra y se dejaron precipitando durante toda la noche en agitación a 200 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 13.000 g durante una hora, conservando sobrenadantes, los cuales fueron filtrados (0,22 µm), para su cuantificación y visualización por medio de un perfil electroforético por SDS-PAGE.

3.8. Obtención de sueros hiperinmunizados con vacunas comerciales contra leptospirosis

Fueron obtenidos sueros murinos inmunizados con dos vacunas para la prevención de la leptospirosis, con el fin de obtener anticuerpos vacunales, como insumo para caracterizar la inmunogenicidad de las tres fracciones de peotrínas leptospirales.

Las inmunizaciones murinas se llevaron a cabo en el bioterio situado en la unidad de biología comparativa (UBC) de la Pontificia Universidad Javeriana (PUJ). Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con los lineamientos establecidos y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales – CICUA de la PUJ. Los profesionales de Agrosavia encargados de esta actividad tomaron y aprobaron

previamente el curso de Formación para Usuarios de Modelos Animales en Investigación, requisito indispensable para el ingreso y manipulación de los animales a inmunizar. Llevaron a cabo las inmunizaciones en la cepa Balb/c de *Mus musculus* endocriados y SPF, con el fin de generar anticuerpos vacunales específicos contra cepas de *Leptospira* (Anexo 3) presentes en dos vacunas comerciales (Bovisan® LEPTO 8 y Blindagán®) en condiciones controladas. Las muestras sanguíneas obtenidas durante los sangrados fueron centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos para la obtención del suero, se hicieron pools de los sueros por grupo de vacunas y estos fueron almacenados a -20° C, para su uso directamente en los inmunoensayos.

3.9. Electroforesis unidimensional (SDS-PAGE) y bidimensional (2-DE)

60 mg/ml de cada una de las fracciones de proteínas (de bacteria completa no solubles, de bacteria completa solubles y secretadas) de los 24 aislamientos y 6 cepas de referencia, fueron resuspendidas en buffer de carga (Tris-HCl 0.5 M pH 8.5, 30% glicerol [v/v], 20% SDS [p/v], 0,01% azul de bromofenol, 15% 2-mercaptoetanol y dH₂O) y calentadas a 90°C durante 5 minutos, para luego separarlas por SDS-PAGE en geles de acrilamida al 12,5%, a 140 V. Los geles fueron teñidos con Coomassie Blue bajo agitación suave y luego aclarados con una solución de metanol 45% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v), para su posterior documentación.

Se realizaron electroforesis bidimensionales (2-DE) de proteínas secretadas y de bacteria completa no solubles de 2 aislamientos de CMISA, a una concentración de 140 mg/ml, las cuales permitieron la separación de las proteínas de acuerdo con su punto Isoeléctrico y masa molecular. Las tiras de IPG (7 cm) con una separación lineal de pH inmovilizado en un rango de 3–10 (ReadyStrip™ IPG Strips, Bio-Rad), se rehidrataron directamente con las proteínas solubilizadas en buffer de hidratación (Urea 6 M, Tiourea 1,5 M, 3% Chaps, DTT 66 mM, 0,5% anfolitos pH 3 – 10 [v/v] y ddH₂O). Las tiras se cubrieron con aceite mineral para evitar deshidratación y oxidación, y el proceso se llevó a cabo durante la noche a temperatura ambiente. El protocolo de isoelectroenfoque fué de 150 V para 150 Vh, 300 V para 300 Vh, 500 V para 500 Vh, 1000 V para 1000 Vh, 2000 V para 2000 Vh y 4000 V para 4000 Vh. Las tiras se equilibraron dos veces (reducidas y alquiladas) durante 15 minutos en agitación en una solución de equilibrio (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, urea 6 M, 87% glicerol [v/v], 2% SDS [p/v] y ddH₂O), primero con la adición de 1% de DTT y

finalmente con 2.5% de yodoacetamida. Después del equilibrio, las tiras se unieron a un gel separador al 12,5%, usando agarosa al 1% con azul de bromofenol. El gel fue sometido a un SDS-PAGE bajo las mismas condiciones de las electroforesis unidimensionales.

3.10. Pruebas de ELISA indirecta

Los antígenos (proteínas de bacteria completa solubles y no solubles y proteínas secretadas) se inmovilizaron en microplacas de fondo plano, de 96 pozos, a una concentración de 4 ng/μl de por pocillo, diluidas en tampón de carbonato-bicarbonato pH 9.6, para un volumen final de 150 μl durante 24 horas a 4 ° C. Se realizaron tres lavados con 150 μl PBS más Tween 20 al 0,2% (PBST; pH 7.2) por pocillo. Las placas se bloquearon con 150 μl por pocillo de solución de bloqueo, que contiene PBST más leche descremada al 5%, durante dos horas a 37°C y se llevaron a cabo tres lavados con 150 μl con PBST; pH 7.2. Las placas se recubrieron con diluciones seriadas de sueros murinos inmunizados o inmunoglobulinas purificadas a partir de sueros bovino por pocillo, diluido en solución de bloqueo, iniciando en una dilución 1:100 y finalizando con una dilución 1:6400, dejando la última fila de las placas siempre como control de reactivos. Se trabajó con un volumen final de cada una de las diluciones de 100 μl durante 2 horas a 37°C en agitación. Para la obtención de los puntos de corte las placas se recubrieron con sueros murinos preinmunizados, como controles negativos, bajo las mismas condiciones. De igual manera, en la última fila cada placa fue recubierta con PBS, como control de reactivos y sometida a las mismas condiciones. Se realizaron tres lavados con 100 μl de PBST; pH 7.2 por pocillo, para recubrirlos posteriormente con 1:5000 de anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano picante (HRP) (Goat Anti-Mouse IgG H&L o Goat Anti-Cow IgG H&L) por pocillo, diluido en solución de bloqueo, para un volumen final de 100 μl durante 1 hora a 37°C en agitación. Se realizaron nuevamente tres lavados cada uno con 100 μl de PBST pH 7.2, para retirar todos los anticuerpos no adheridos a la placa. Finalmente se agregaron 100 μl de OPD por reacción y nuevamente se incubó por 30 minutos a 37°C en oscuridad. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido sulfúrico 0.1 M, para posterior lectura de la densidad óptica (DO) final usando un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 492 nm. El cálculo de los puntos de corte para cada una de las fracciones se realizó tomando la media de las DO obtenidas a partir de las placas en las que se usó suero preinmunizado como anticuerpo primario, más

tres veces la desviación estándar. Los títulos de anticuerpos para cada cepa y cada fracción de proteínas fueron medidos de acuerdo a la última dilución de anticuerpo secundario obtenida por encima de los valores de punto de corte.

3.11. Western Blot

Fueron separadas proteínas secretadas y de bacteria completa no solubles de 5 aislamientos de CMISA (3 P1 y 2 P2), a una concentración de 60 mg/ml por SDS-PAGE. Una parte de los geles fueron teñidos con Coomassie Blue bajo agitación suave y luego aclarados, para su posterior documentación. El resto de los geles fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa (Amersham™ Protran™ 0.2µm NC - GE) por 1 hora a 100 V. Las membranas fueron incubadas con una solución de PBST con leche descremada al 5% para su bloqueo e incubadas durante la noche en agitación a 30 rpm a 4°C. La solución de bloqueo fue descartada para la realización de tres lavados de las membranas con PBST, cada uno de 15 minutos, para posterior incubación en agitación, durante dos horas con diluciones de 1:100 de los sueros murinos inmunizados con la vacuna Bovisan® LEPTO 8 o las inmunoglobulinas precipitadas a partir de sueros bovinos. Posterior a la incubación se realizaron tres lavados de las membranas con PBST, cada uno de 15 minutos. Finalmente, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios específicos conjugado a HRP en dilución 1:5000 (Goat Anti-Mouse IgG H&L o Goat Anti-Cow IgG H&L) por dos horas en agitación. Posterior a la incubación se realizaron tres lavados de las membranas con PBST, cada uno de 15 minutos y fueron reveladas por medio del sustrato 4-cloro-1-naftol (Opti-4CN™ Substrate Kit #1708235, Bio-Rad).

3.12. Identificación de proteínas inmunoreactivas

Una vez observadas las bandas correspondientes a las proteínas reactivas en el Western Blot, se procedió a identificar los puntos correspondientes a éstas bandas en los geles 2-DE teñidos con Coomassie blue. Estos puntos fueron cortados por separado y fueron enviados para su debida identificación por medio de Espectrofotometría de masas como servicio externo en la Universidad de Costa Rica – Instituto Clodomiro Picado.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Clasificación taxonómica de los aislamientos de la CMISA

La CMISA cuenta con 30 cepas de referencia y 55 aislamientos de diversos hospederos y muestras biológicas, dentro del género *Leptospira*. Para el presente proyecto se llevó a cabo la confirmación de la identificación de los clados (P o S) y subclados (P1 - patógenas, P2 – intermedias, S1 y S2 saprofitas) de los 55 aislamientos, listados en el anexo 1. La identificación se llevó a cabo por medio de la amplificación de una región del gen *rrs*, el cual ha sido ampliamente usado para la detección molecular de microorganismos pertenecientes al género (Comia et al., 2018; Waggoner & Pinsky, 2016). Por medio de los iniciadores A/B (Merien et al., 1992) se logró la amplificación de un fragmento de 331 pb en los 55 aislamientos del Banco, permitiendo de esta manera la confirmación del género *Leptospira* para los mismos, como se muestra en la figura 3.

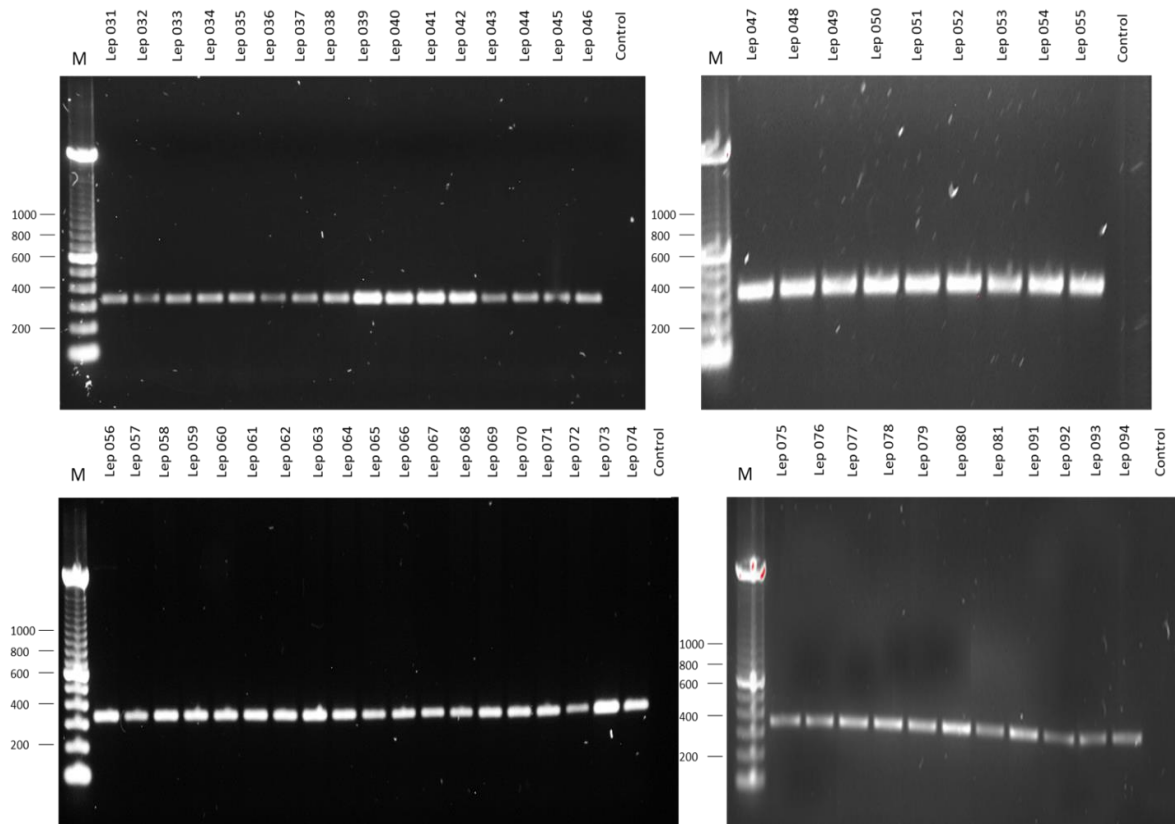


Figura 3. Amplificación de una región del gen *rrs* en los 55 aislamientos de *Leptospira* spp. que hacen parte de CMISA.

Los productos de la amplificación de una región del gen *rrs* de los 55 aislamientos fueron enviados a secuenciar y con la información de las secuencias se realizó la construcción del árbol filogenético de la figura 4, que permitió la diferenciación de los dos grandes clados, agrupando en el clado P, 53 de los aislamientos y en el clado S, dos de los aislamientos (Lep 041 y Lep 072). A su vez en el clado P se observa la división en los subclados P1, y P2. Dentro del subclado P1 se agrupan 29 de los aislamientos de CMISA, mientras que en el subclado P2 se agrupan 24 aislamientos. Aunque no se tienen datos sobre prevalencias de especies de patogenicidad intermedia, el alto número de aislamientos clasificados dentro de este grupo, coinciden con los reportes sobre la presencia de estas especies en territorio colombiano (Romero-Vivas et al., 2013; Sánchez et al., 2017).

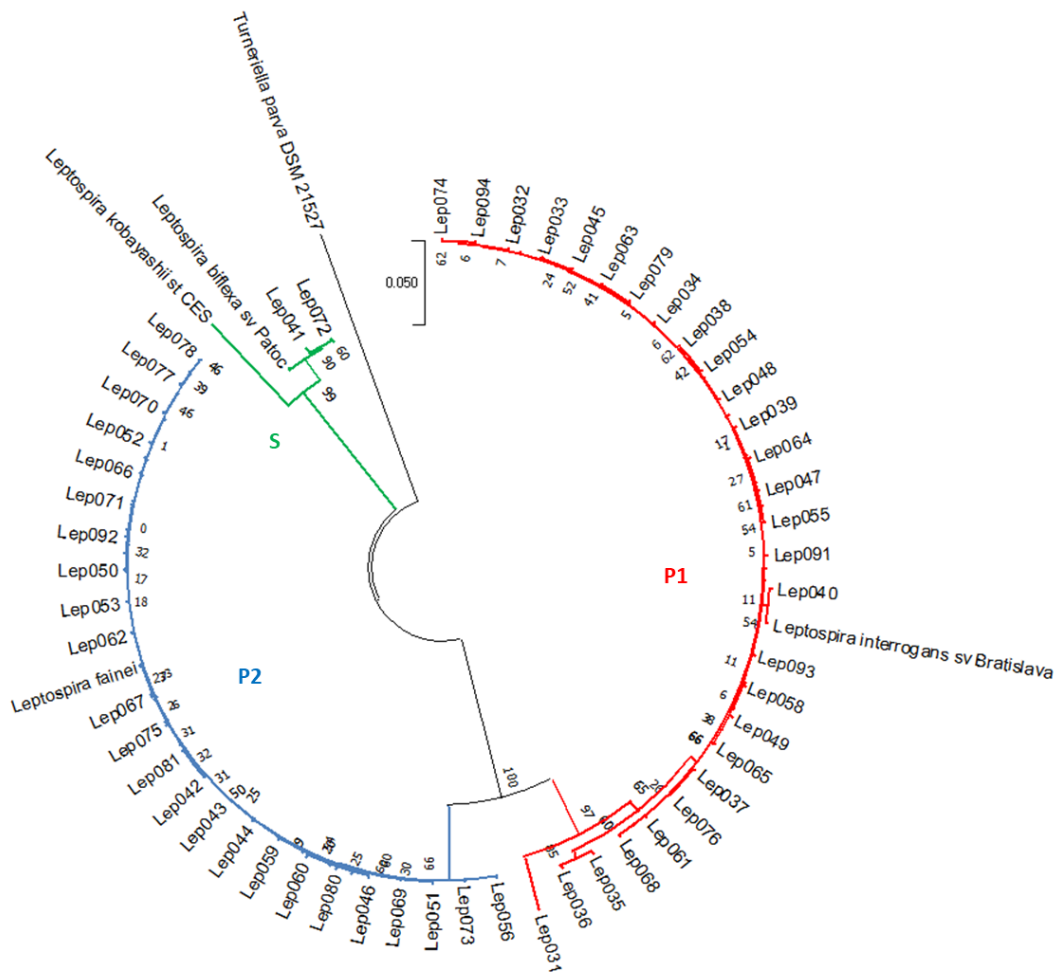


Figura 4. Árbol filogenético construido a partir de una región del gen *rrs* de los 55 aislamientos de *Leptospira* spp. que hacen parte de CMISA.

A partir de la confirmación del subclado de los 55 aislamientos, fueron seleccionados 24 aislamientos para la obtención de proteínas y posteriores inmunoensayos, los cuales se muestran en la tabla 2. Los parámetros que se tuvieron en cuenta para la elección de estos aislamientos fueron origen biológico, distribución dentro del árbol filogenético y una evaluación de factores de virulencia, realizada con anterioridad a este proyecto por CMISA.

Tabla 2. Aislamientos de CMISA seleccionados para los inmunoensayos

ID CMISA	Clado	Subclado	Fuente	Factores de virulencia				Proteína hipotética 11834
				gen ompL1	gen lipL32	gen loa22	gen ligB	
1 Lep031	P	P1	Bovino	+	+	+	-	-
2 Lep032	P	P1	Bovino	+	+	+	+	+
3 Lep035	P	P1	Porcino	+	+	+	+	-
4 Lep036	P	P1	Porcino	+	+	+	+	-
5 Lep037	P	P1	Bovino	+	+	+	+	+
6 Lep040	P	P1	Humano	+	+	+	+	+
7 Lep045	P	P1	Humano	+	+	+	+	+
8 Lep049	P	P1	Porcino	+	+	+	+	+
9 Lep054	P	P1	Canino	+	+	+	+	+
10 Lep058	P	P1	Roedor	+	+	+	+	+
11 Lep064	P	P1	Ambiental- agua	+	+	+	+	+
12 Lep091	P	P1	Bovino	+	+	+	+	+
13 Lep042	P	P2	Humano	-	+	-	-	-
14 Lep044	P	P2	Humano	-	+	-	-	-
15 Lep051	P	P2	Porcino	-	+	+	+	-
16 Lep056	P	P2	Roedor	-	-	-	+	-
17 Lep059	P	P2	Roedor	-	+	+	+	-
18 Lep067	P	P2	Ambiental- agua	-	+	+	+	-
19 Lep070	P	P2	Ambiental- agua	+	+	-	+	-
20 Lep077	P	P2	Ambiental- agua	-	-	-	-	-
21 Lep078	P	P2	Ambiental- agua	-	-	+	+	-
22 Lep080	P	P2	Bovino	-	+	+	+	-

23	Lep081	P	P2	Bovino	-	+	+	+	-
24	Lep092	P	P2	Bovino	+	-	-	+	-

4.2. Obtención de proteínas a partir de aislamientos y cepas de referencia de *Leptospira* de la CMISA

Fue realizada la obtención de tres fracciones de proteínas de 24 aislamientos de la CMISA y seis cepas de referencia. De los aislamientos elegidos, 12 fueron clasificados dentro del subclado P1 y 12 dentro del P2 (Tabla 2). Por otro lado, las seis cepas de referencia (Tabla 3) utilizadas fueron elegidas teniendo en cuenta su presencia en la mayoría de las vacunas disponibles para la prevención de la leptospirosis.

Tabla 3. Cepas de referencia seleccionadas en el estudio

ID CMISA	Clado	Subclado	Especie	Serovar	Cepa	Origen
1 Lep009	P	P1	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Hond Utrecht IV 9	INTA-Argentina
2 Lep014	P	P1	<i>L. interrogans</i>	Grippotyphosa	Moskva V	INTA-Argentina
3 Lep015	P	P1	<i>L. borgpetersenii</i>	Hardjo	Hardjo-bovis	INNPAZ-Argentina
4 Lep016	P	P1	<i>L. interrogans</i>	Hardjo	Hardjoprajitmo	INTA-Argentina
5 Lep018	P	P1	<i>L. interrogans</i>	Copenhageni		INTA-Argentina
6 Lep025	P	P1	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	INTA-Argentina

Proteínas de bacteria completa no solubles

La primera fracción de proteínas corresponde a las proteínas de bacteria completa no solubles, dentro de la cual se pueden encontrar proteínas citoplasmáticas, periplasmáticas y de membrana interna y externa (Gonzalez et al., 2003), no solubles. La mayoría de las proteínas no solubles reportadas en *Leptospira* spp. son OMPs y teniendo en cuenta su exposición al medio extracelular, presentan un potencial antigénico importante por su contacto directo con el sistema inmune de su hospedero en el proceso de infección (Grassmann et al., 2017; Nascimento et al., 2018). Los perfiles obtenidos se encuentran en la Figura 5, donde se evidencian bandas desde 11 hasta 200 KDa, con patrones heterogéneos. A pesar de la heterogeneidad de estos patrones, resaltan algunas bandas que se puede observar conservadas en aislamientos y cepas de referencia.

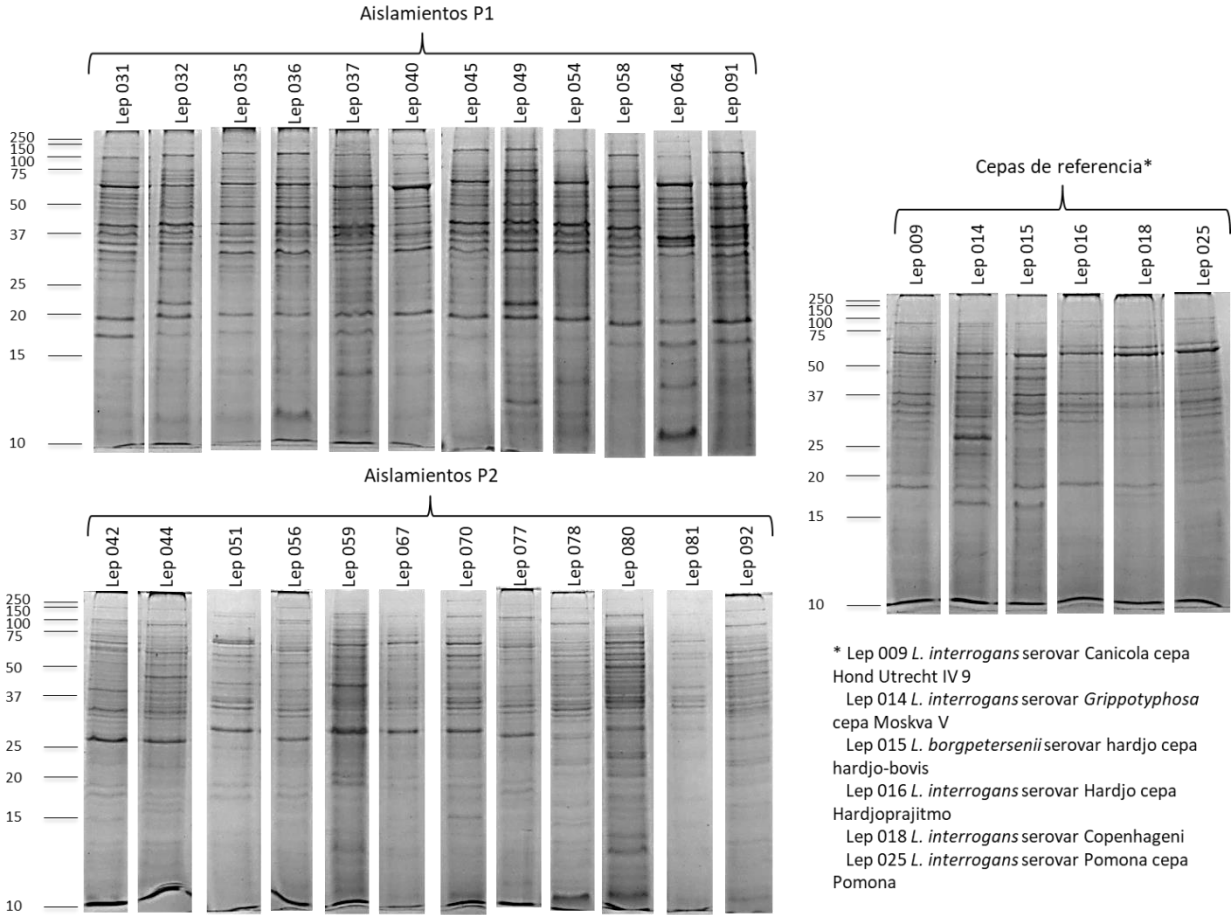


Figura 5. Gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie, con proteínas de bacteria completa no solubles de aislamientos y cepas de referencia de *Leptospira* spp. de la CMISA.

En todos los aislamientos P1 y cepas de referencia, así como en algunos aislamientos P2, como Lep 051, se puede observar una banda de 61,2 a 63,4 KDa, que podría corresponder a las lipoproteínas de membrana reportadas LruA de 62 KDa (Verma et al., 2005) o Lsa63 de 63 KDa (Vieira et al., 2010). También se observan una serie de bandas, que resaltan en los aislamientos P1, que se encuentran entre los 31,3 y 46,9 KDa, que podrían corresponder a las lipoproteínas LipL32 de 32 KDa (Haake et al., 2000), LipL36 de 36 KDa (Haake et al., 1998), LipL45 de 45 KDa (Matsunaga et al., 2002) o las proteínas transmembranales OmpL36 de 36 KDa, OmpL37 de 37 KDa (Pinne & Haake, 2009) y OmpL1 de 31 – 33 KDa (Evangelista et al., 2014; Shang et al., 1995).

Por último predomina una banda que oscila entre 18,5 a 29,6 KDa tanto en aislamientos P1 y cepas de referencia, como en aislamientos P2, que corresponden a pesos moleculares característicos de LPS, reconocidos como responsables de producir inmunidad T independiente (Doungchawee et al., 2008).

En las electroforesis bidimensionales de dos aislamientos (Lep 032 – P1 y Lep 051 – P2), cuyos geles se muestran en la figura 6, se pueden observar proteínas de baja abundancia, que se refleja en puntos de baja intensidad o difusos. Por el contrario, se pueden observar varios puntos de proteínas, que se distribuyen principalmente entre los puntos isoeléctricos (pIs) 4 – 7 y están casi ausentes en rangos de pH básicos. Estos datos se encuentran de acuerdo con estudios previos que han demostrado la focalización de las proteínas leptospirales entre pls 4 y 7 (Vieira et al., 2009). Se observan tres puntos conservados en los aislamientos, el primero con 66,5 a 69,2 KDa y pl de 4,8 a 5, el segundo con 33,9 a 37,4 KDa y pl de 4 a 4,4 y el tercero con 31,9 a 35,6 KDa y pl entre 4,3 y 4,4.

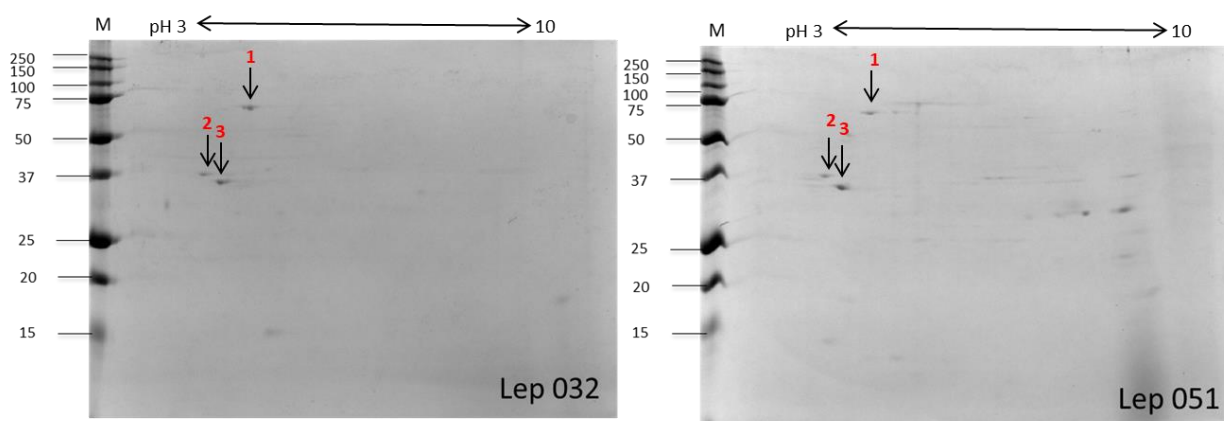


Figura 6. Geles de 2-DE teñidos con azul de Coomassie con proteínas de bacteria completa no solubles, de dos aislamientos (Lep 032 – P1 y Lep 051 – P2).

Proteínas de bacteria completa solubles

La segunda fracción corresponde a proteínas de bacteria completa solubles, que pueden corresponder a proteínas citoplasmáticas, periplasmáticas y de membrana interna y algunas de externa como OmpL37 y OmpL47 (González Rodríguez et al., 2003; Pinne & Haake, 2009), no obstante el mayor porcentaje de proteínas reportadas como solubles para *Leptospiras* P1, corresponden a proteínas citoplasmáticas (Humphryes et al., 2014),

por lo cual su exposición al sistema inmune es bastante reducida dentro del proceso infeccioso, disminuyendo así su potencial antigénico (Grassmann et al., 2017). Los perfiles de proteínas de ésta fracción se muestran en la figura 7, en los cuales se evidencian que algunas bandas de proteínas son compartidas entre algunos aislamientos, sin embargo, no se evidencia un patrón común tanto P1 como P2 y cepas de referencia. Se pueden observar bandas de proteínas desde 20 y por encima de 150 KDa.

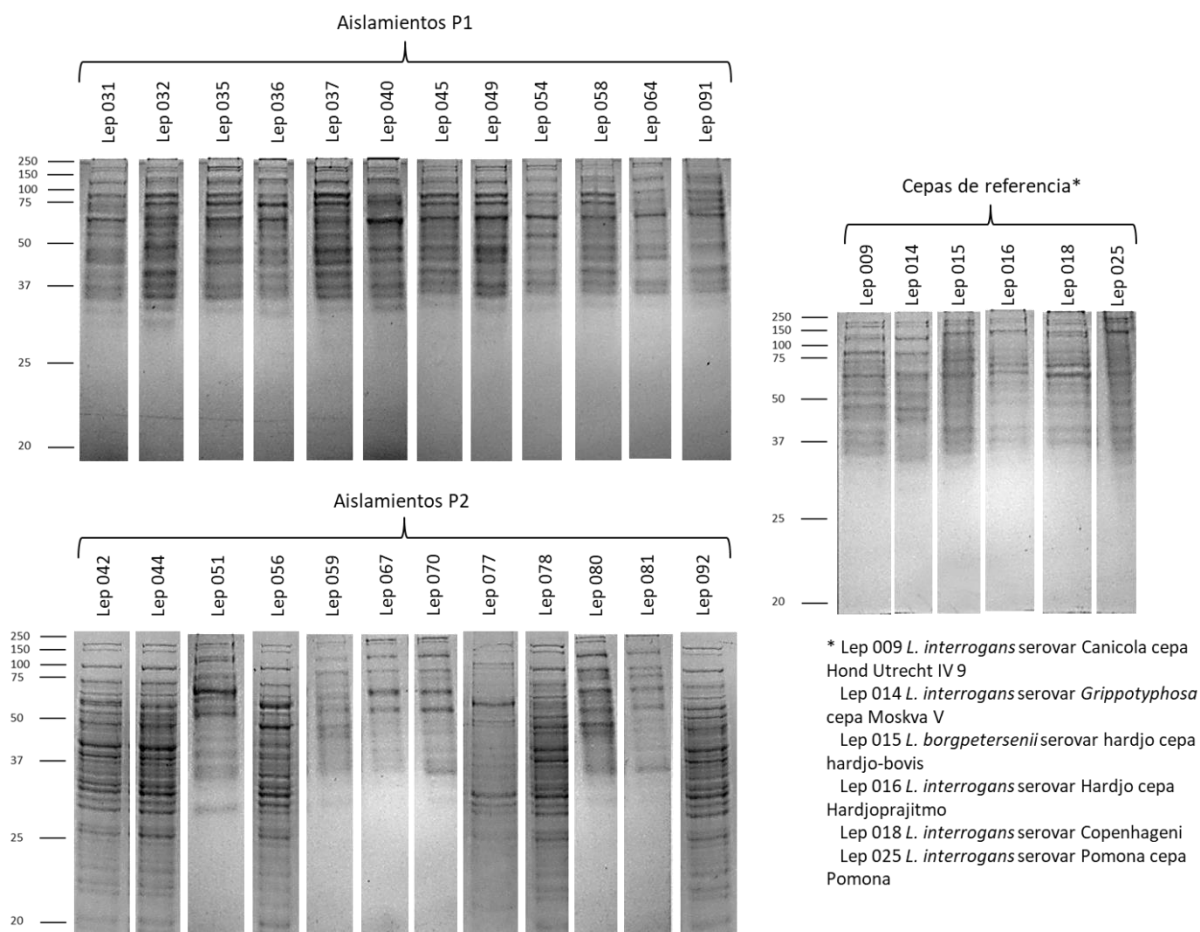


Figura 7. Gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie, con proteínas de bacteria completa solubles de aislamientos y cepas de referencia de *Leptospira* spp. de la CMISA.

Proteínas secretadas

La última fracción de proteínas fue de proteínas secretadas, es decir todas las proteínas liberadas por *Leptospira* spp. al medio extracelular. Para la obtención de dichas proteínas los cultivos de *Leptospira* spp. fueron sometidos a estrés térmico y osmótico. Lo anterior

teniendo en cuenta, por un lado, que se ha evidenciado que muchos genes leptospirales son regulados por mecanismos de termorregulación (Lo et al., 2006). De igual manera se ha encontrado que la osmolaridad constituye una parte importante en el control de la expresión de proteínas leptospirales (Haake D. A, 2018).

Los perfiles electroforéticos de las proteínas secretadas de los 24 aislamientos y las seis cepas de referencia son presentados en la figura 8. Se evidencian bandas de diversos pesos moleculares, desde 150 a 13 KDa en la mayoría de los perfiles. Sin embargo, resalta una banda que oscila entre 60 y 74,5 KDa, que se encuentra conservada en las cepas de referencia y los aislamientos de los subclados P1 y P2, pesos moleculares que corresponden a diversas proteínas secretadas reportadas con anterioridad. Dentro de éstas proteínas reportadas se cuentan la hemolisina SphH de *L. interrogans* serovar Lai, de 64 KDa (Lee et al., 2002) y las subunidades Sph1, Sph2 y Sph3 de la Fosfodiesterasa de esfingomielina Sph también de *L. interrogans* serovar Lai, cuyas masas moleculares son 68.192, 71.030 y 64.433 KDa, respectivamente (Zhang et al., 2005). También han sido reportadas proteínas con actividad gelatinasa de 66, 71 y 72 KDa, encontradas por zimografía (da Silva et al., 2018; Madathiparambil et al., 2011). De igual manera en *L. interrogans* serovar Kennewicki cepa Fromm fueron identificadas 10 proteínas del exoproteoma que oscilan entre 60,354 y 73,904 KDa, entre las cuales se encuentran una Acetolactato sintasa (60,962 KDa), Coenzima A transferasa (65,478 KDa) y Acetilcoenzima A sintetasa (73,306KDa) (da Silva et al., 2018).

En la figura 9 se muestra la misma fracción de proteínas secretadas, separadas mediante geles de 2-DE, que se focalizaron en el rango de pH de 3-10 y la masa molecular se separó en geles de acrilamida al 12,5%, teñidos con azul de Coomassie. Se pueden observar varios puntos de proteínas para los aislamientos Lep 032 y Lep 051 que se distribuyen principalmente entre los puntos isoeléctricos (pIs) 4 – 7 y están casi ausentes en rangos de pH básicos. La banda que se observó conservada en los perfiles por SDS-PAGE, se observa para Lep 032 con dos grandes puntos de 60 KDa con pIs entre 5 y 5,2, y para Lep 051 con 5 puntos de 55 KDa con pIs entre 5,2 y 5,7.

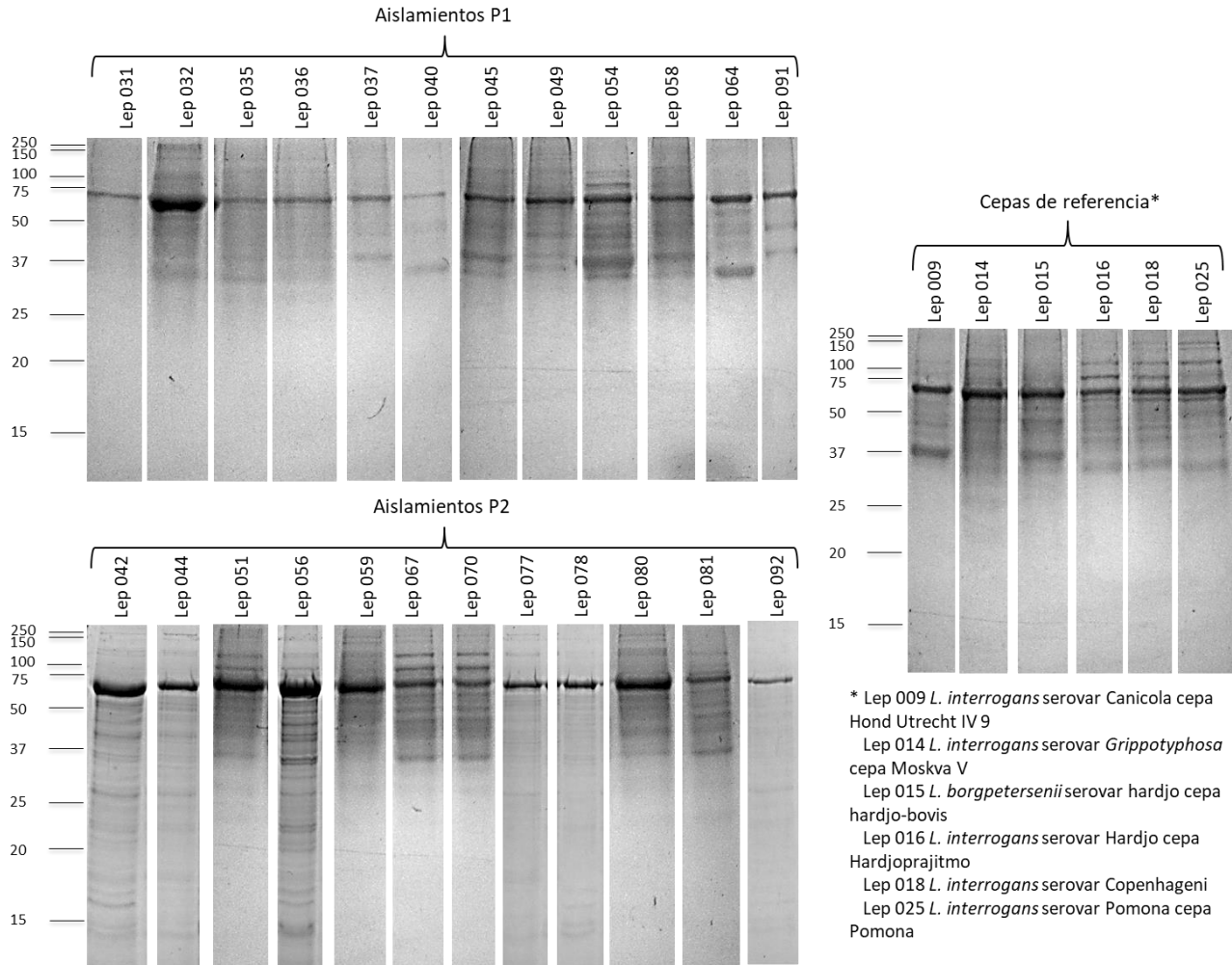


Figura 8. Gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie, con proteínas secretadas de aislamientos y cepas de referencia de *Leptospira* spp. de la CMISA.

4.3. Anticuerpos vacunales y de infección

A partir de los sueros obtenidos de bovinos, se realizó la purificación de inmunoglobulinas por medio de sulfato de amonio y ácido caprílico, las cuales se separaron por peso molecular en un SDS-PAGE, cuyo resultado se muestra en la figura 10. Las inmunoglobulinas purificadas por los dos métodos permitieron la observación de las cadenas pesada o cadena H y liviana o cadena L, de las cuales se reportan pesos moleculares aproximados de 50 y 25 KDa respectivamente (Janeway et al., 2001). Sin embargo, para las inmunoglobulinas obtenidas por medio de sulfato de amonio, se

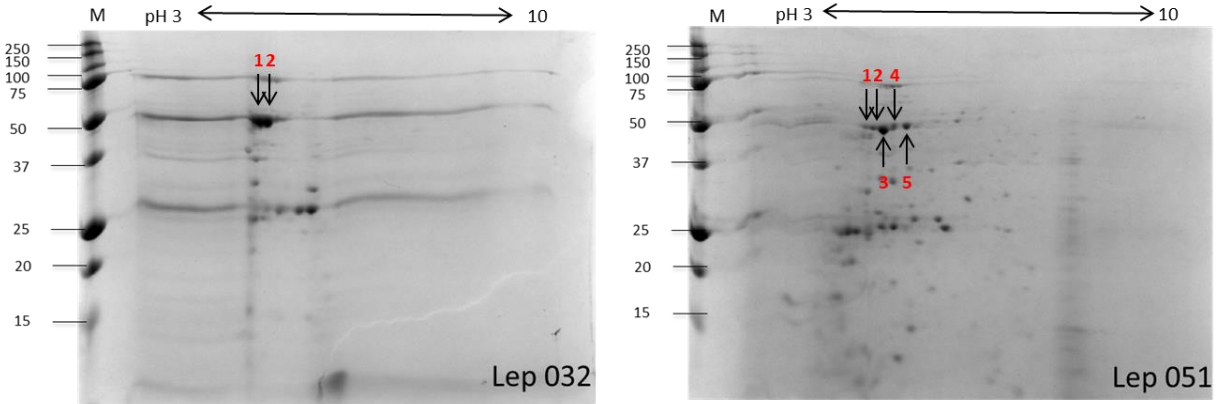


Figura 9. Geles de 2-DE teñidos con azul de Coomassie con proteínas secretadas, de dos aislamientos (Lep 032 – P1 y Lep 051 – P2).

pueden observar proteínas de menor peso molecular, por lo cual se decidió trabajar con las inmunoglobulinas purificadas por medio de ácido caprílico para los inmunoensayos posteriores. Adicional a esto fueron obtenidos sueros murinos preinmunizados e inmunizados, a partir de la vacunación de dos grupos de ratones con las vacunas comerciales Bovisan® LEPTO 8 y Blindagán®, para su directa utilización en los inmunoensayos posteriores.

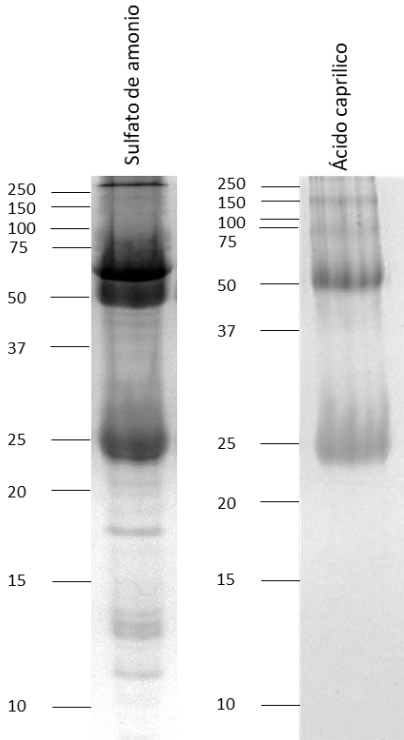


Figura 10. Gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie, con inmunoglobulinas precipitadas con Sulfato de amonio y Ácido caprílico, a partir de sueros.

4.4. Inmunoensayos

Teniendo los insumos necesarios (antígenos y anticuerpos), se llevaron a cabo pruebas de ELISA para medir la reactividad de las diferentes fracciones de proteínas leptospirales, frente a inmunoglobulinas producidas a partir de la vacunación (sueros murinos) y frente a inmunoglobulinas producidas a partir de reto en campo (inmunoglobulinas purificadas a partir de sueros bovinos). Para la medición de los títulos en cada uno de los ensayos que se llevaron a cabo, primero se obtuvieron los puntos de corte de cada una de las fracciones de proteínas de las seis cepas de referencia, enfrentadas a sueros murinos preinmunizados, cuyas curvas de titulación se encuentran en la figura 11. Para la determinación de los puntos de corte se fue calculada la media y la desviación estándar de las absorbancias obtenidas a 492 nm, en las diferentes diluciones seriadas de los sueros preinmunes. Se establecieron puntos de corte para los experimentos en la absorbancia de 0,24 para proteínas secretadas, 0,27 para proteínas de bacteria completa solubles y 0,22 para proteínas de bacteria completa no solubles, a partir de los valores de la media, más tres desviaciones estándar.

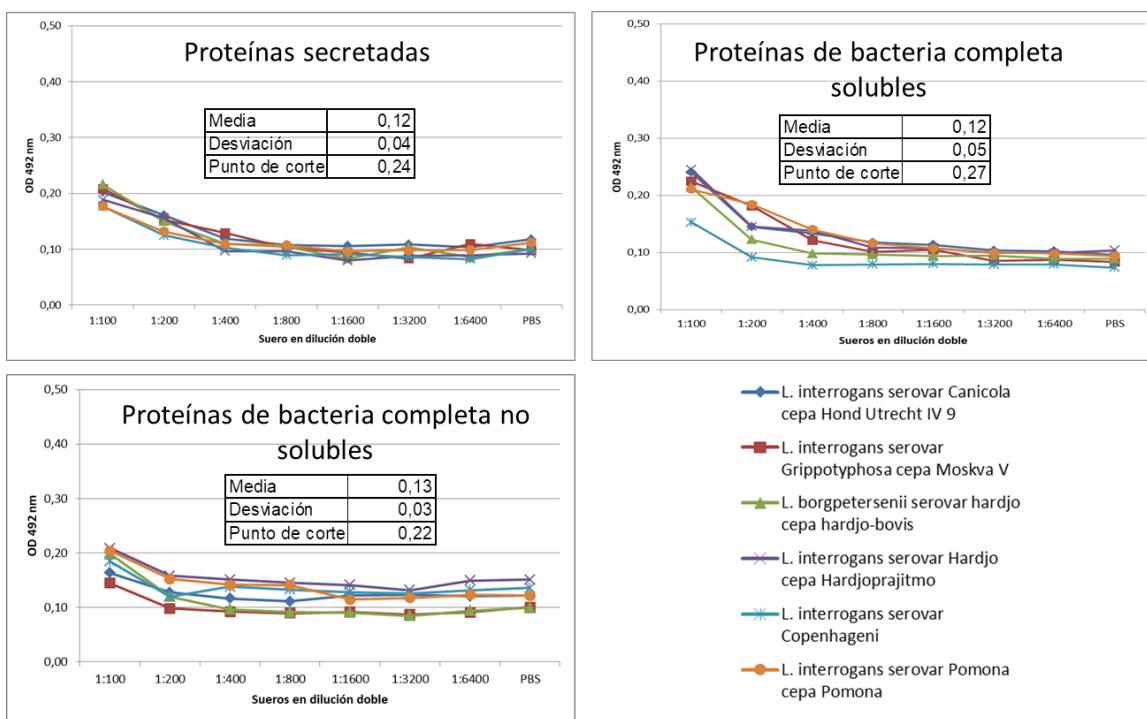


Figura 11. Curvas de titulación de pruebas de ELISA utilizando como antígenos las tres fracciones de proteínas de cepas de referencia, frente a sueros murinos pre-inmunizados.

Una vez establecidos los puntos de corte, fueron enfrentadas mediante pruebas de ELISA las diferentes fracciones de proteínas leptospirales de las cepas de referencia, con los sueros murinos inmunizados y las inmunoglobulinas de infección, para la medición de los títulos de anticuerpos. En la figura 12 se pueden observar los títulos de anticuerpos de las tres fracciones de proteínas enfrentadas a los sueros murinos inmunizados con vacunas comerciales, cuya información se encuentra en el anexo 2. Para la vacuna Bovisan® LEPTO 8 fueron obtenidos los mayores títulos tanto para las proteínas secretadas (1600), con los serovares Grippotyphosa, Hardjo y Copenhageni, en comparación con la vacuna Blindagan®, en la cual, los títulos más altos (3200) fueron obtenidos en proteínas de bacteria completa no solubles del serovar Hardjo. Los títulos bajos de las proteínas de bacteria completa no solubles, enfrentadas a los sueros inmunizados de las dos vacunas evaluadas, se correlacionan con mediciones de títulos por MAT, para la evaluación de la respuesta inmune de vacunas leptospirales en bovinos (Fávero et al., 2018). Al enfrentar las tres fracciones de proteínas de las cepas de referencia, con las inmunoglobulinas obtenidas a partir de sueros bovinos (Figura 10), se alcanzaron títulos de 200 y 400 con las proteínas secretadas de tres cepas de referencia y títulos nulos con las otras tres. La fracción de proteínas de bacteria completa solubles, presentaron títulos con todas las cepas evaluadas, de entre 100 y 400. De igual forma se presentaron títulos de hasta 800 con la fracción de proteínas de bacteria completa no solubles, fracción en la cual puede ser encontrados los LPS, responsables de la inmunidad tipo T independiente (Dounghawee et al., 2008).

Se evaluaron de igual forma las tres fracciones de proteínas de los 24 aislamientos de CMISA, enfrentadas tanto a sueros murinos inmunizados, como a inmunoglobulinas de infección. En la figura 13 se pueden observar los títulos de anticuerpos obtenidos tanto para aislamientos P1 como P2, enfrentados a los sueros murinos inmunizados, resultados que permiten evidenciar la baja protección que presentan algunas vacunas disponibles, frente a aislamientos de *Leptospira* circulantes en el territorio colombiano. Se evidencia de nuevo que la fracción de proteínas de bacteria completa solubles presenta los títulos más bajos o nulos, independientemente de los aislamientos evaluados o la vacuna utilizada para la inmunización de los murinos. Para los aislamientos P1 se encontraron títulos bajos en las fracciones de proteínas secretadas y de bacteria completa no solubles, mientras que para los aislamientos P2 la mayor respuesta inmune se ve asociada a proteínas de bacteria completa no solubles, con títulos de hasta 800

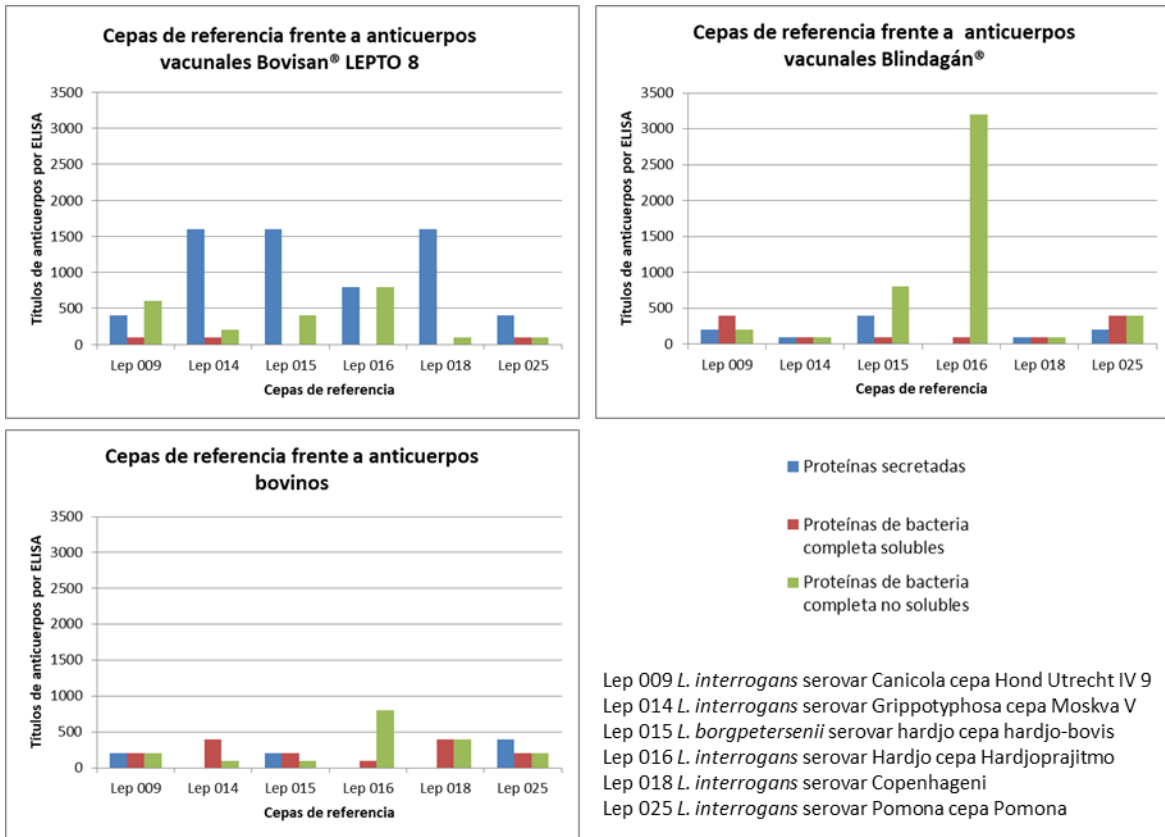


Figura 12. Títulos de anticuerpos obtenidos por ELISA para las proteínas de cepas de referencia enfrentadas a sueros murinos con anticuerpos vacunales a partir de la inmunización con dos vacunas comerciales y a anticuerpos purificados a partir de sueros bovinos.

Para la última etapa de las pruebas de ELISA se midieron los títulos de anticuerpos, enfrentando las tres fracciones de proteínas de los 24 aislamientos, a las inmunoglobulinas purificadas a partir de sueros bovinos, resultados que se muestran en la figura 14. No son evidentes diferencias significativas en los títulos obtenidos para los aislamientos P1 y P2. Para todos los aislamientos fueron obtenidos títulos de 100 o 200, independientemente la fracción de proteínas evaluada. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos por Carrizo et al. (2009), en los que ni por medio de MAT ni por ELISA, fue posible obtener resultados positivos al evaluar sueros de llama con leptospirosis, y formulan la hipótesis que las mezclas antigénicas no permiten obtener la sensibilidad necesaria para la detección positiva.

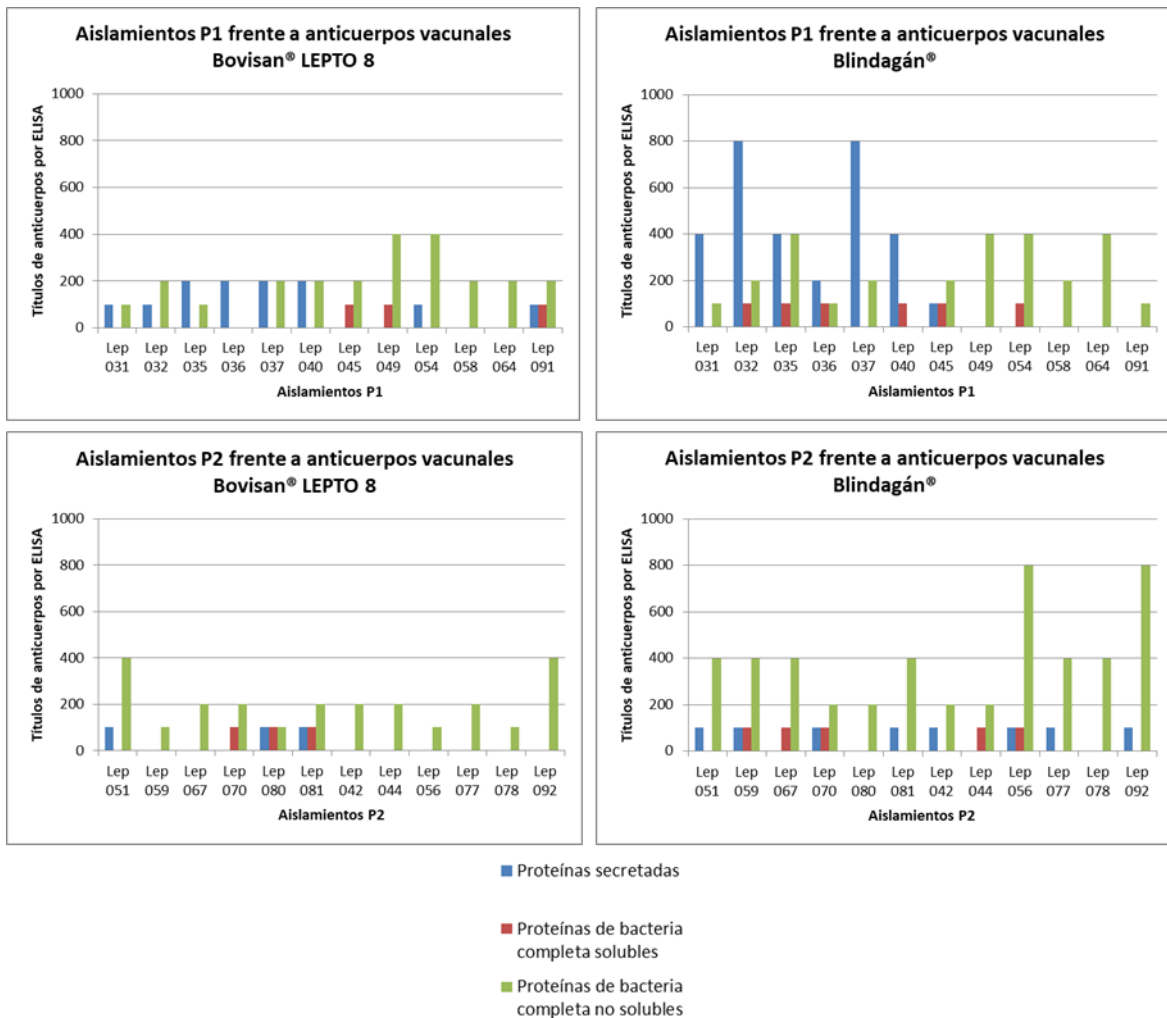


Figura 13. Títulos de anticuerpos obtenidos por ELISA para las proteínas de aislamientos P1 y P2 de la CMISA enfrentadas a sueros murinos inmunizados con dos vacunas comerciales.

Con el fin de evidenciar la reactividad específica de proteínas leptospirales separadas por peso molecular, fueron realizados Western Blots, en los cuales se evaluaron las fracciones de proteínas de bacteria completa no solubles y secretadas, teniendo en cuenta la baja reactividad presentada con las proteínas de bacteria completa solubles de los aislamientos, encontrada por medio de las pruebas de ELISA. Dichas fracciones de proteína correspondían a tres aislamientos P1 y dos P2. Estas dos fracciones fueron enfrentadas a los sueros murinos inmunizados con la vacuna Bovisan® LEPTO 8, teniendo en cuenta que en su composición solo se encuentran serovares de *Leptospira*, y frente a las inmunoglobulinas purificadas a partir de sueros bovinos.

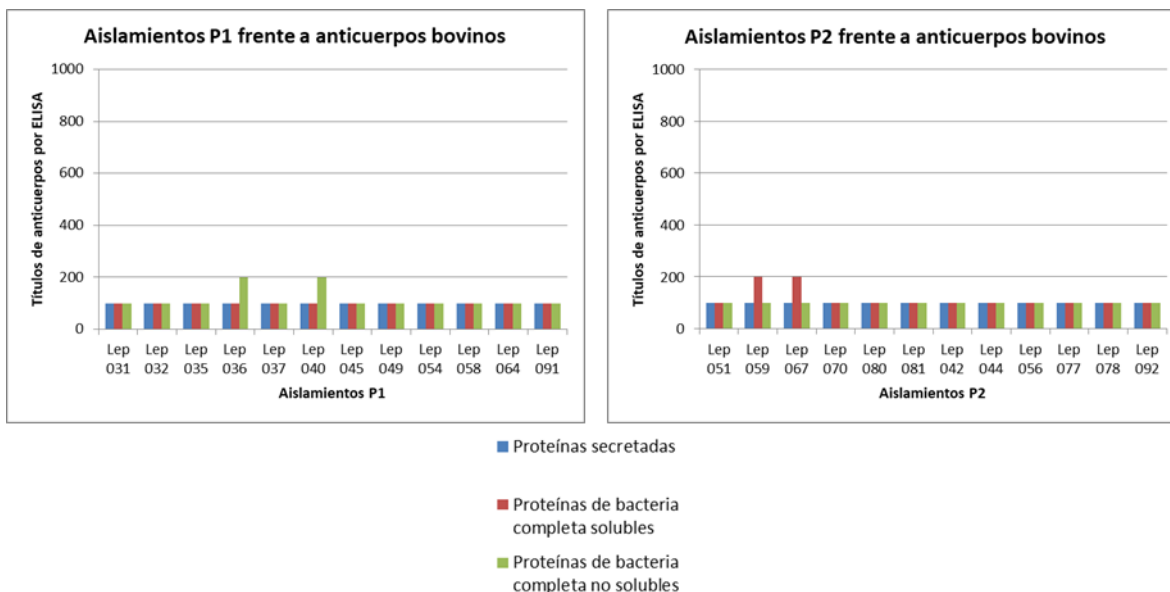


Figura 14. Títulos de anticuerpos obtenidos por ELISA para las proteínas de aislamientos P1 y P2 de la CMISA enfrentadas a inmunoglobulinas purificadas a partir de sueros bovinos.

La primera de las fracciones evaluadas fue de proteínas de bacteria completa no solubles. Al igual que en el inmunoensayo inmediatamente anterior, las proteínas de los aislamientos P1 Lep 032, Lep 035 y Lep 037 y los aislamientos P2 Lep 051 y Lep 080, fueron separadas por medio de un SDS-PAGE (Figura 15A) y transferidas a membranas de nitrocelulosa, para ser enfrentadas a sueros murinos inmunizados con la vacuna Bovisan® LEPTO 8 (Figura 15B) o al pool de inmunoglobulinas de infección (Figura 15C). Al enfrentarlas con los sueros murinos, se pudo observar reactividad en bandas de pesos moleculares aproximados para Lep 032 (40,2 y 24 KDa) y Lep 035 (39,9 y 25,5 KDa), lo que podría indicar una banda conservada para aislamientos P1, pero no común para todo el clado P. La banda de menos peso molecular, podría corresponder a la lipoproteína de membrana externa LipL21, reportada con reactividad para sueros bovinos anteriormente (Carrizo, et al., 2009). Para Lep 037 se presentó, al igual que en la fracción de proteínas secretadas una reactividad exacerbada, con muchas proteínas del carril. El aislamiento P2 Lep 051 presentó una leve reactividad en una banda correspondiente a 66 KDa,

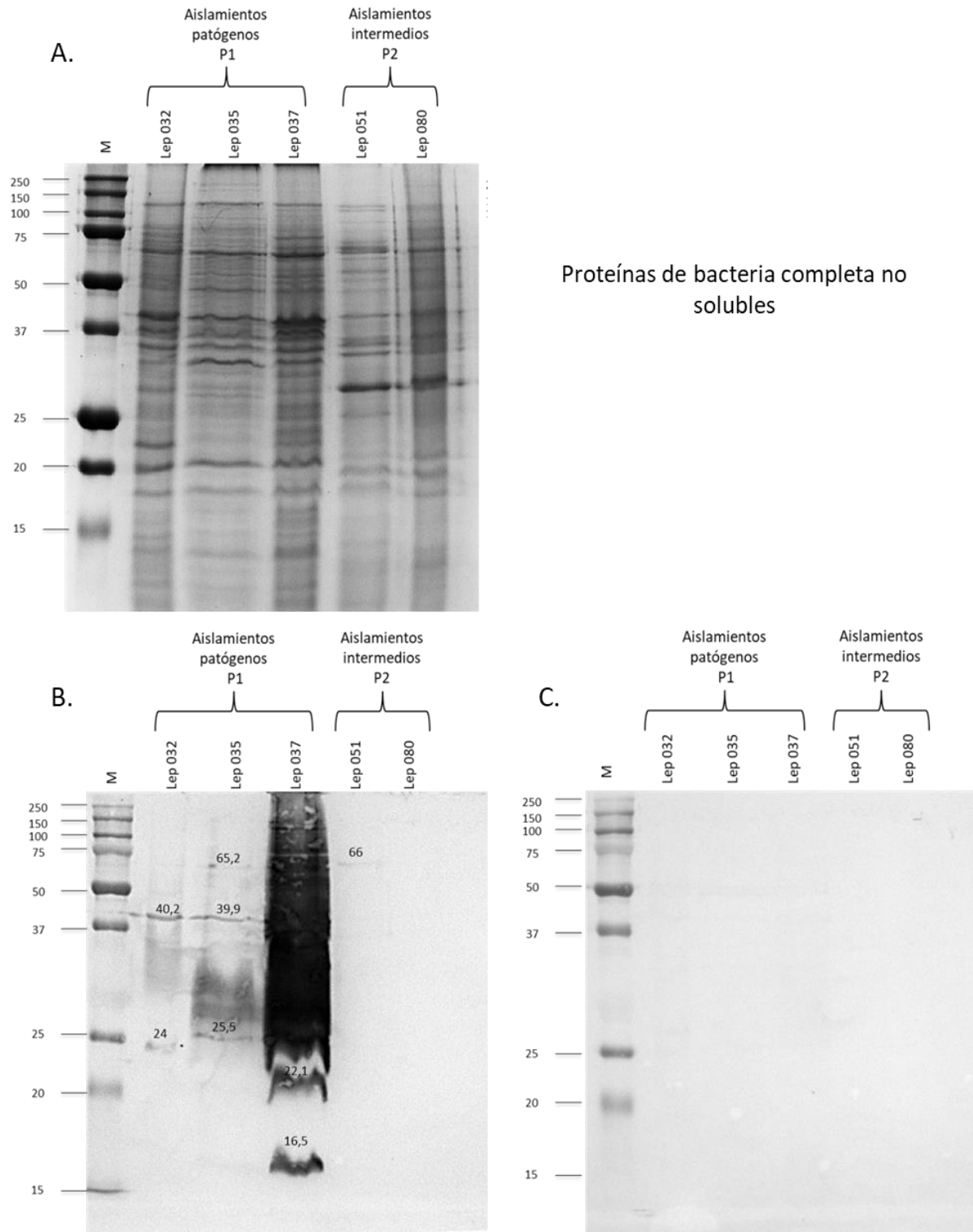


Figura 15. Análisis por Western blot de la reactividad de proteínas de bacteria completa no solubles de aislamientos de la CMISA. A. Gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie, con proteínas de bacteria completa no solubles de tres aislamientos P1 y dos P2, transferidos a membranas de nitrocelulosa para ser enfrentados a B. sueros murinos inmunizados con la Vacuna Bovisan® LEPTO 8 - Virbac e C. inmunoglobulinas purificadas a partir de sueros de infección.

mientras que en el otro aislamiento P2 (Lep 080) no se presentó ningún tipo de reactividad. La membrana que fue enfrentada a las inmunoglobulinas de infección no presentó reactividad con ninguno de los aislamientos.

La segunda fracción evaluada fue la de proteínas secretadas; en la figura 16A se puede observar el perfil de proteínas para esta fracción de los aislamientos P1 Lep 032, Lep 035 y Lep 037 y los aislamientos P2 Lep 051 y Lep 080, en los cuales se evidencia de nuevo la banda conservada de entre 60 y 74,5 KDa, observada en los perfiles iniciales (Figura 8). Estas bandas separadas por SDS-PAGE fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y enfrentadas a sueros murinos inmunizados con la vacuna Bovisan® LEPTO 8 (Figura 16B) o a las inmunoglobulinas de infección (Figura 16C). Se puede observar reactividad con los sueros murinos, en bandas de los aislamientos P1 Lep 032 (62,2 KDa), Lep 037 (67,3 KDa) y para el aislamiento P1 Lep 051 (64,7 KDa), que corresponden a la banda conservada descrita con anterioridad. También se presenta reactividad exacerbada con gran cantidad de bandas para el aislamiento P1 Lep 037. Por el contrario, no se puede observar ningún tipo de reactividad con el aislamiento P2 Lep 080. En cuanto a las inmunoglobulinas de infección, no se evidencia reactividad con ninguna de las bandas, lo cual podría indicar que la reactividad observada en las pruebas de ELISA, aunque baja, puede deberse a proteínas en conformación nativa, al igual que con las proteínas de bacteria completa no solubles.

La identificación de proteínas expuestas en la superficie bacteriana o secretadas, es importante para entender las interacciones de *Leptospira* con el ambiente (hospedero) y por tanto la posibilidad de usarlas como antígenos protectores ante las diferentes especies causantes de enfermedad dentro del género, ya sean pertenecientes al subclado P1 o P2. Para éste caso, aspectos como la abundancia de los posibles antígenos protectores (Cullen et al., 2005) o el tipo de estímulo externo que necesita la bacteria para traducir y transcribir una proteína (Picardeau, 2015) se hacen relevantes, en el momento de generar una respuesta inmune.

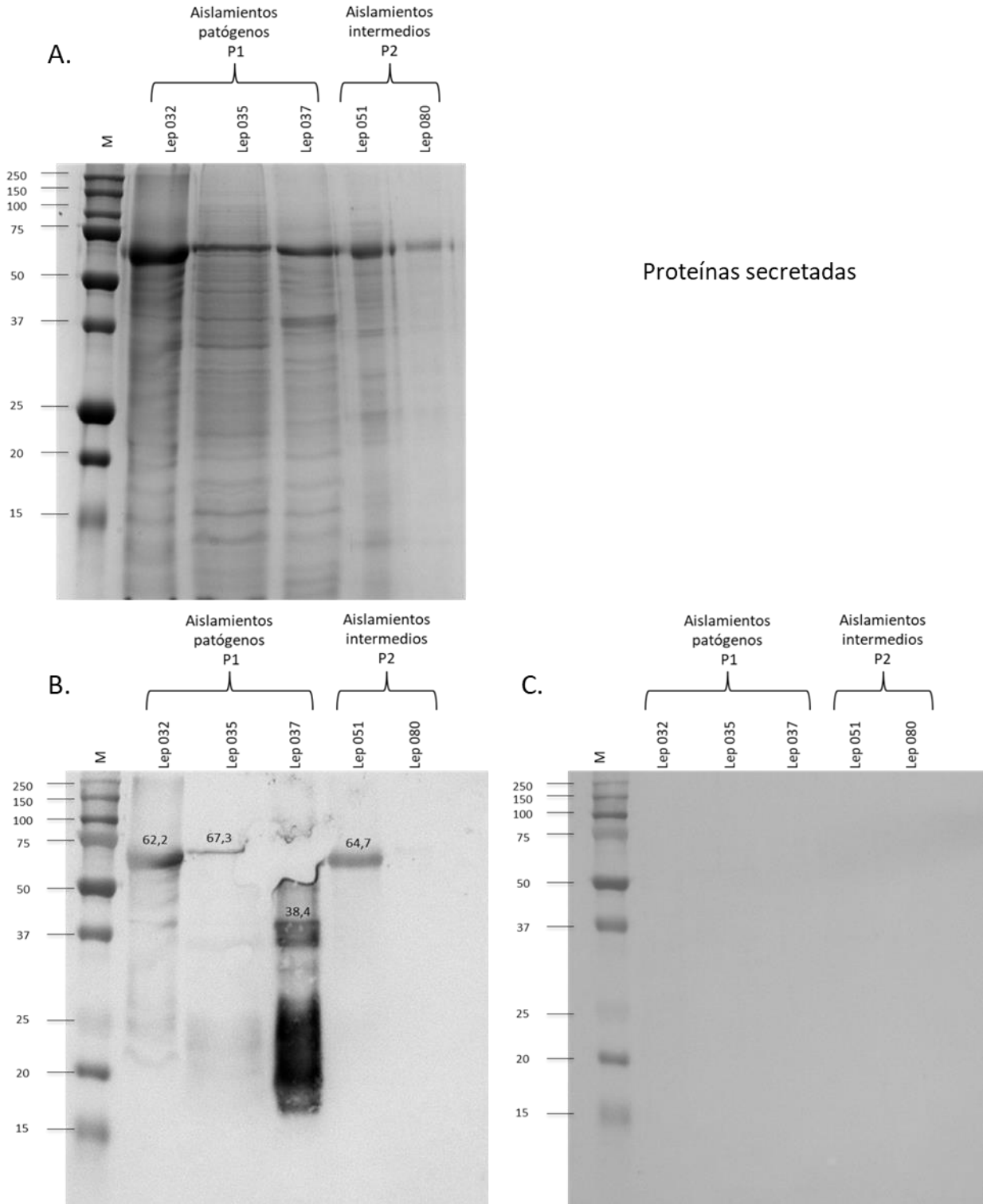


Figura 16. Análisis por Western blot de la reactividad de proteínas secretadas de aislamientos de la CMISA. A. Gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie, con proteínas de bacteria completa no solubles de tres aislamientos P1 y dos P2, transferidos a membranas de nitrocelulosa para ser enfrentados a B. sueros murinos inmunizados con la Vacuna Bovisan® LEPTO 8 - Virbac e C. inmunoglobulinas purificadas a partir de sueros de infección.

Teniendo en cuenta lo anterior, al analizar las tres diferentes fracciones de proteínas, se evidencia que las que tienen mayor potencial como inmunógenos son las proteínas de bacteria completa no solubles y las proteínas secretadas, teniendo en cuenta su interacción con el sistema inmune en el momento de la infección. La capacidad de generar una respuesta inmune por parte de la fracción de proteínas de bacteria completa solubles es menor, teniendo en cuenta que la mayoría de proteínas reportadas como solubles, hacen parte del citoplasma de *Leptospira* (Grassmann et al., 2017; Humphries et al., 2014).

En cuanto a la fracción de proteínas de bacteria completa no solubles, las más reportadas son las OMPs. Dentro de estas, las proteínas identificadas como más abundantes son LipL32, LipL21 y LipL41 (Cullen et al., 2005). LipL32 presente tanto en P1 como en P2, se considera un factor de virulencia importante, ya que mejora la hemólisis mediada por la esfingomielinasa SphH y ha sido identificada como una proteínas inmunogénica (Humphries et al., 2014), sin embargo, en el momento de ser usada como inmunógeno, no evita la colonización de los órganos por parte de *Leptospira* (Maneewatch et al., 2008). De igual manera LipL41, la cual no ha sido reportada en P2, ha presentado inmunoprotección parcial al ser combinada con la proteína transmembranal OmpL1 (Haake et al., 1999). Por último la proteína LipL21 ha demostrado su reactividad frente a sueros bovinos positivos para leptospirosis (Carrizo et al., 2009), proteína que por peso molecular podría corresponder a la bandas que presentaron reactividad en ésta fracción de proteínas precisamente, para los aislamientos P1 Lep 032 y Lep 035, pero no para ninguno de los aislamientos P2 (Figura 15B).

La última fracción de proteínas evaluada, las proteínas secretadas, muestran un potencial como inmunógeno alternativo no-serovar dependiente, teniendo en cuenta la reactividad presentada en bandas de entre 62,2 y 67,3 KDa, tanto en aislamientos P1 como P2 (Figura 16B). Existen varias proteínas secretadas bien caracterizadas para especies P1, como proteasas (da Silva et al., 2018) y hemolisinas (Zhang et al., 2005), sin embargo no se han encontrado estudios sobre sus contrapartes en el subclado P2. De igual forma se encuentran contados antecedentes de estudios de éstas proteínas como inmunógenos (Hashimoto et al., 2013), lo cual abre una puerta para ésta proteína reactiva a nivel experimental para futuras investigaciones sobre el papel de las proteínas secretadas en la inmunidad frente a leptospirosis.

De acuerdo a los resultados obtenidos en éste trabajo se pudo confirmar el bajo o nulo potencial inmunogénico de proteínas citoplasmáticas y periplasmáticas, presentes para éste caso en la fracción de proteínas de bacteria completa solubles (Figuras 12 y 13). Por el contrario las fracciones de proteínas de bacteria completa no solubles y proteínas secretadas, demostraron ser candidatos para la prevención de la leptospirosis (Figuras 15 y 16), lo que sería de gran importancia para el control de la enfermedad, principalmente en animales de producción como los bovinos. Frente a la posibilidad de producir reactividad cruzada entre especies P1 y P2, las proteínas secretadas son las fracción con mayor potencial, de acuerdo con los inmunoensayos de la figura 16.

4.5. Identificación de proteínas inmunoreactivas

A partir de los 5 puntos del gel de Lep 051 intermedia -P2 de la figura 9, los cuales corresponden a la banda inmunoreactiva de la figura 16B en el mismo aislamiento P2, fue posible la identificación de las proteínas Enolasa, Factor de iniciación de la traducción 2 (IF2) y Factor de Elongación Tu (EF-Tu), con puntajes en el patrón de péptidos (-10lgP) de 60,54, 73,21 y 238,87 respectivamente (Anexo 3). La proteína IF2 ha sido reportada como una proteína citoplasmática para asegurar que la síntesis de proteínas comience en el codón correcto dentro de un ARN mensajero (Laursen, 2004). En cuanto a las proteínas Enolasa y EF-Tu, ambas han sido anteriormente identificadas inicialmente como proteínas citoplasmáticas, sin embargo se ha demostrado que pueden ser exportadas a la membrana externa de *Leptospira* y secretadas, para la evasión del sistema de complemento, razón por la cual se identifican como proteínas *Moonlighting* (Salazar & Barbosa, 2017).

La Enolasa leptospiral dentro del citoplasma es responsable de la conversión de 2-fosfoglicerato a fosfoenopiruvato durante la glicólisis (Nogueira et al., 2013). Por otro lado, la enolasa secretada extracelularmente, se ha demostrado que se une a C4BP y al Factor H del sistema de complemento, contribuyendo a la inactivación de C4b y C3b (Barbosa & Isaac, 2020). Para el caso de EF-Tu, inicialmente se reportó participando en la síntesis de proteínas en el citoplasma, sin embargo se ha demostrado su habilidad para unirse a factores del sistema de complemento (Factor H) y plasminógeno, permitiendo la desactivación de C3b que se encuentren opsonizando la superficie bacteriana y activando

la plasmina, la cual permite la degradación de proteínas del plasma sanguíneo (Barbosa & Isaac, 2020; Harvey et al., 2019).

Al igual que en los resultados obtenidos en el presente estudio, se ha evidenciado la inducción de anticuerpos en estudios anteriores, por parte de las dos proteínas identificadas. Fueron encontrados por un lado, anticuerpos contra la enolasa en hamsters infectados con *L. interrogans* (Nogueira et al., 2013), y por otro lado han sido encontrados anticuerpos contra EF-Tu durante infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma capricolum*, *Chlamydia trachomatis* y *Burkholderia pseudomallei*, entre otros microorganismos (Widjaja et al., 2017). No se tiene aún completa claridad sobre los sistemas de secreción de estas proteínas *Moonlighting*, sin embargo se habla de su potencial como blancos terapéuticos (Jeffery, 2018). Éstos antecedentes demuestran el gran potencial como inmunógenos de las proteínas secretadas y para éste caso específico, las proteínas Enolasa y EF-Tu, que se ha demostrado están presentes en leptospiras P1 y P2, generando reactividad cruzada.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con el objetivo de caracterizar proteínas con reactividad cruzada entre especies P1 y P2 de *Leptospira* spp, se hizo uso de los aislamientos que hacen parte de CMISA del Banco de Microorganismos de Agrosavia, de diferentes orígenes biológicos y partes del país.

Se llevó a cabo la confirmación de la clasificación taxonómica por medio de la amplificación del gen *rrs*, el cual representó una herramienta eficaz para la confirmación del género *Leptospira* dentro de los clados P y S, así como dentro de los subclados P1 y P2. La identificación de un alto número de aislamientos (24/55) dentro del subclado P2 (Figura 4), evidencia la alta circulación de estas especies, teniendo en cuenta que CMISA es un reflejo de la diversidad del género en Colombia.

De acuerdo a los resultados de las pruebas de Elisa con sueros hiperinmunes, queda en evidencia que las vacunas que se encuentran disponibles para la prevención de la leptospirosis, no generan reactividad significativa frente a proteínas provenientes de aislamientos circulantes dentro del territorio Colombiano (Figura 13).

La evidencia de una banda de proteínas secretadas que presentó reactividad (Figura 16), conservada en aislamientos tanto P1 como P2, identificadas como Enolasa, IF2 y EF-Tu, permite visibilizar un antígeno que pueda solucionar algunos de los problemas que se tienen en la actualidad con las vacunas leptospirales, teniendo en cuenta que permitiría la generación de reactividad cruzada y por su naturaleza proteica, posibilitaría la generación de memoria inmune T dependiente, lo que implica la inmunización a largo plazo, por lo cual podría considerarse un candidato vacunal o de diagnóstico idóneo.

A nivel metodológico, considerando que las proteínas leptospirales se encuentran casi ausentes en pHs básicos, sería importante realizar electroforesis 2-DE con tiras IPG de pH inmovilizado en un rango de 4-7, aumentando la concentración, para obtener mayor definición de los puntos (Figuras 6 y 9). De igual manera es importante la evaluación de la reactividad por Western blot de proteínas nativas, para la identificación de epítomos discontinuos que puedan también ser candidatos vacunales o de diagnóstico (Figuras 15 y 16).

A partir de los datos obtenidos dentro del presente proyecto, podría llevarse a cabo un diseño experimental, que permita la evaluación de las proteínas secretadas que presentaron reactividad. La formulación de una vacuna que incluya un inmunógeno de origen proteico, para la prevención de la leptospirosis, permitiría reducir los efectos negativos de esta infección en las ganaderías del país, lo que redundaría en el impulso de la economía de éste sector.

BIBLIOGRAFIA

- Abdullah, M., Kadivella, M., Sharma, R., Baig, M. S., Faisal, M., Azam, S., & Faisal, S. M. (2021). Comparative analysis of whole genome sequences of *Leptospira* spp. from RefSeq database provide interspecific divergence and 2 repertoire of virulence factors. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.01.12.426470>
- Adler, B. (2015a). History of leptospirosis and leptospira. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_1
- Adler, B. (2015b). Vaccines against leptospirosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387, 251–272. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_10
- Amamura, T. A., Fraga, T. R., Vasconcellos, S. A., Barbosa, A. S., & Isaac, L. (2017). Pathogenic *Leptospira* secreted proteases target the membrane attack complex: A potential role for thermolysin in complement inhibition. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00958>
- Anderson, M. L. (2007). Infectious causes of bovine abortion during mid- to late-gestation. *Theriogenology*, 68(3), 474–486. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.001>
- Ayral, F. (2013). La leptospirose dans les cheptels bovins laitiers en France : impact économique de l'infection. *Bulletin Des GTV*, 69, 61–68.
- Balamurugan, V., Gangadhar, N. L., Mohandoss, N., Rahim, S., Thirumalesh, A., Dhar, M., Shome, R., Krishnamoorthy, P., Prabhudas, K., & Rahman, H. (2013). *Characterization of leptospira isolates from animals and humans: phylogenetic analysis identifies the prevalence of intermediate species in India*. <http://www.springerplus.com/content/2/1/362>
- Bandara, M., Ananda, M., Wickramage, K., Berger, E., & Agampodi, S. (2014). Globalization of leptospirosis through travel and migration. In *Globalization and Health* (Vol. 10, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12992-014-0061-0>
- Barbosa, A. S., & Isaac, L. (2020). Strategies used by *Leptospira* spirochetes to evade the host complement system. In *FEBS Letters* (Vol. 594, Issue 16, pp. 2633–2644). Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13768>
- Bellows, D., Ott, S., & Bellows, R. (2002). Cost of Reproductive Diseases and Conditions in Cattle. *The Professional Animal Scientist*, 18, 26–32. [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)31480-7](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)31480-7)
- Benavides, B. B., Jurado, C., & Cedeño, Q. D. (2010). Factores de riesgo asociados a

- aborto bovino en la cuenca lechera del departamento de Nariño. *Revista MVZ Cordoba*, 15(2), 2087–2094.
- Bernheimerl, A. W., & Bey2, R. F. (1986). Copurification of *Leptospira interrogans* Serovar pomona Hemolysin and Sphingomyelinase C. *Infection and Immunity*, 54(1), 262–264.
- Betancur, C., Orrego, A., & González, M. (2013). Seroepidemiología de la leptospirosis en bovinos con trastornos reproductivos en el municipio de Montería, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, 26, 47–55.
- Bezerra Da Silva, J., Carvalho, E., Hartskeerl, R. A., & Ho, P. L. (2011). Evaluation of the use of selective PCR amplification of LPS biosynthesis genes for molecular typing of *Leptospira* at the serovar level. *Current Microbiology*, 62(2), 518–524.
<https://doi.org/10.1007/s00284-010-9738-7>
- Bharti, A. R., Nally, J. E., Ricaldi, J. N., Matthias, M. A., Diaz, M. M., Lovett, M. A., Levett, P. N., Gilman, R. H., Willig, M. R., Gotuzzo, E., & Vinetz, J. M. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(12), 757–771. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00830-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00830-2)
- Boey, K., Shiokawa, K., & Rajeev, S. (2019). *Leptospira* infection in rats: A literature review of global prevalence and distribution. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(8), e0007499. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007499>
- Branger, C., Chatrenet, B., Gauvrit, A., Aviat, F., Aubert, A., Bach, J. M., & André-Fontaine, G. (2005). Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. *Infection and Immunity*, 73(7), 4062–4069. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.7.4062-4069.2005>
- Builes-Jaramillo, A., & Arias-Monsalve, C. S. (2019). Impact of El Niño-Southern oscillation on human leptospirosis in Colombia at different spatial scales. *Journal of Infection in Developing Countries*, 13(12), 1108–1116. <https://doi.org/10.3855/jidc.11702>
- Caimi, K., & Ruybal, P. (2020). *Leptospira* spp., a genus in the stage of diversity and genomic data expansion. In *Infection, Genetics and Evolution* (Vol. 81). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104241>
- Calderaro, A., Piccolo, G., Gorrini, C., Montecchini, S., Buttrini, M., Rossi, S., Piergianni, M., De Conto, F., Arcangeletti, M. C., Chezzi, C., & Medici, M. C. (2014). *Leptospira* species and serovars identified by MALDI-TOF mass spectrometry after database implementation. *BMC Research Notes*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-330>

- Cameron, C. E. (2015). Leptospiral structure, physiology, and metabolism. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387, 21–41. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_3
- Carreño, L. A., Salas, D., & Beltrán, K. B. (2017). Prevalencia de leptospirosis en colombia: Revisión sistemática de literatura. In *Revista de Salud Publica* (Vol. 19, Issue 2, pp. 204–209). Universidad Nacional de Colombia. <https://doi.org/10.15446/rsap.v19n2.54235>
- Carrizo, A., Brihuega, B., Etchechoury, I., Arese, A., & Romero, S. (2009). *Identificación de antígenos inmunorreactivos de Leptospira interrogans*. 129–133.
- Carrizo, A., Brihuega, B., Etchechoury, I., Arese, A., Romero, S., Gioffré, A., Romano, M. I., & Caimi, K. (2009). Identificación de antígenos inmunorreactivos de *Leptospira interrogans*. *Revista Argentina de Microbiología*, 41, 129–133.
- Cassalett, E. R., Patiño, R. E., Rodríguez, J. L., & Parra, J. L. (2016). Estudio de variabilidad genética en aislamientos de *Leptospira* spp., en sistemas bovinos de carne y doble propósito. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 17(2), 229–236.
- Chiriboga, J., Barragan, V., Arroyo, G., Sosa, A., Birdsell, D. N., España, K., Mora, A., Espín, E., Mejía, M. E., Morales, M., Pinargote, C., Gonzalez, M., Hartskeerl, R., Keim, P., Bretas, G., Eisenberg, J. N. S., & Trueba, G. (2015). High prevalence of intermediate leptospira spp. DNA in febrile humans from urban and rural Ecuador. *Emerging Infectious Diseases*, 21(12), 2141–2147. <https://doi.org/10.3201/eid2112.140659>
- Comia, I., Madureira, A. C., Schooley, R. T., Vieira, M. L., & Virgínia Noormahomed, E. (2018). Molecular Detection of *Leptospira* spp. in Rodents Trapped in the Mozambique Island City, Nampula Province, Mozambique. *EC Microbiology*, 14(12), 813–821.
- Costa, F., Hagan, J. E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M. S., Stein, C., Abela-Ridder, B., & Ko, A. I. (2015). Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>
- Cruse, J., Lewis, R., & Wang, H. (2004). T Cells and the Thymus. In J. Cruse, R. Lewis, & H. Wang (Eds.), *Immunology Guidebook* (978th-0-12th-198382nd–6th ed., pp. 311–338). Academic Press.
- Cullen, P. A., Cordwell, S. J., Bulach, D. M., Haake, D. A., & Adler, B. (2002). Global

- analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infection and Immunity*, 70(5), 2311–2318. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.5.2311-2318.2002>
- Cullen, P. A., Xu, X., Matsunaga, J., Sanchez, Y., Ko, A. I., Haake, D. A., & Adler, B. (2005). Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infection and Immunity*, 73(8), 4853–4863. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4853-4863.2005>
- da Cunha, C. E. P., Bettin, E. B., Bakry, A. F. A. A. Y., Seixas Neto, A. C. P., Amaral, M. G., & Dellagostin, O. A. (2019). Evaluation of different strategies to promote a protective immune response against leptospirosis using a recombinant LigA and LigB chimera. *Vaccine*, 37(13), 1844–1852. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.02.010>
- da Silva, L. B., Menezes, M. C., Kitano, E. S., Oliveira, A. K., Abreu, A. G., Souza, G. O., Heinemann, M. B., Isaac, L., Fraga, T. R., Serrano, S. M. T., & Barbosa, A. S. (2018). *Leptospira interrogans* secreted proteases degrade extracellular matrix and plasma proteins from the host. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(MAR). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00092>
- de Alvarenga Mudadu, M., Carvalho, V., & Leclercq, S. Y. (2015). Nonclassically Secreted Proteins as Possible Antigens for Vaccine Development: A Reverse Vaccinology Approach. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(7), 3360–3370. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1507-4>
- Dellagostin, O. A., Grassmann, A. A., Rizzi, C., Schuch, R. A., Jorge, S., Oliveira, T. L., McBride, A. J. A., & Hartwig, D. D. (2017). Reverse vaccinology: An approach for identifying leptospiral vaccine candidates. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18010158>
- Dhandapani, G., Sikha, T., Pinto, S. M., Kiran Kumar, M., Patel, K., Kumar, M., Kumar, V., Tennyson, J., Satheeshkumar, P. K., Gowda, H., Keshava Prasad, T. S., & Madanan, M. G. (2018). Proteomic approach and expression analysis revealed the differential expression of predicted leptospiral proteases capable of ECM degradation. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1866, 712–721. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2018.04.006>
- Dhandapani, G., Sikha, T., Rana, A., Brahma, R., Akhter, Y., & Gopalakrishnan Madanan, M. (2018). Comparative proteome analysis reveals pathogen specific outer membrane proteins of *Leptospira*. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 86(7), 712–722. <https://doi.org/10.1002/prot.25505>
- Dong, S. L., Hu, W. L., Ge, Y. M., Ojcius, D. M., Lin, X., & Yan, J. (2017). A leptospiral

- AAA+ chaperone-Ntn peptidase complex, HslUV, contributes to the intracellular survival of *Leptospira interrogans* in hosts and the transmission of leptospirosis. *Emerging Microbes & Infections*, 6(11), e105. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.93>
- Doungchawee, G., Kositanont, U., Niwetpathomwat, A., Inwisai, T., Sagarasaeranee, P., & Haake, D. A. (2008). Early diagnosis of leptospirosis by immunoglobulin M immunoblot testing. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(3), 492–498. <https://doi.org/10.1128/CVI.00152-07>
- Draghi, M., Brihuega, B., Benítez, D., Sala, J., Biotti, G., Pereyra, M., Homse, A., & Guariniello, L. (2011). Brote de leptospirosis en terneros en recría en la provincia de Corrientes, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 43, 42–44.
- Ellis, W.A., & Little, T. W. A. (1986). The present state of leptospirosis diagnosis and control. In W.A. Ellis & T. W. A. Little (Eds.), *Current topics in veterinary medicine and animal science*. (36th ed.). Springer Netherlands.
- Ellis, William A. (2015). Animal Leptospirosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387, 99–137. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_6
- Evangelista, K. V., Hahn, B., Wunder, E. A., Ko, A. I., Haake, D. A., & Coburn, J. (2014). Identification of Cell-Binding Adhesins of *Leptospira interrogans*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003215>
- Eve Andr E-Fontaine, G., & Triger, L. (2018). MAT cross-reactions or vaccine cross-protection: retrospective study of 863 leptospirosis canine cases. *Heliyon*, 4, 869. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018>
- Faisal, S. M., McDonough, S. P., & Chang, Y. F. (2012). *Leptospira*: Invasion, pathogenesis and persistence. In *The Pathogenic Spirochetes: Strategies for Evasion of Host Immunity and Persistence* (Vol. 9781461454045, pp. 143–172). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5404-5_8
- Faisal, S. M., Yan, W., McDonough, S. P., Mohammed, H. O., Divers, T. J., & Chang, Y. F. (2009). Immune response and prophylactic efficacy of smegmosomes in a hamster model of leptospirosis. *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.08.029>
- Fávero, J. F., Fritzen, A., Lovato, L. T., Martins, P., Baldissera, M. D., Stefani, L. M., & Da Silva, A. S. (2018). Immune response of a commercial vaccine against *Leptospira interrogans*: Antibodies and cytokine levels. *Microbial Pathogenesis*, 114, 46–49. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.042>
- Fernandes, L. G., Siqueira, G. H., Teixeira, A. R. F., Silva, L. P., Figueredo, J. M., Cosate, M. R., Vieira, M. L., & Nascimento, A. L. T. O. (2016). *Leptospira* spp.: Novel insights

- into host–pathogen interactions. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 176, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.12.004>
- Fernandes, L. G. V., Teixeira, A. F., Filho, A. F. S., Souza, G. O., Vasconcellos, S. A., Heinemann, M. B., Romero, E. C., & Nascimento, A. L. T. O. (2017). Immune response and protective profile elicited by a multi-epitope chimeric protein derived from *Leptospira interrogans*. *International Journal of Infectious Diseases*, 57, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.01.032>
- Fishman, J. B., & Berg, E. A. (2018). Ammonium sulfate fractionation of antibodies. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), 472–474. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot099119>
- Fraga, T. R., Courrol, D. D. S., Castiblanco-Valencia, M. M., Hirata, I. Y., Vasconcellos, S. A., Juliano, L., Barbosa, A. S., & Isaac, L. (2014). Immune evasion by pathogenic *Leptospira* strains: The secretion of proteases that directly cleave complement proteins. *Journal of Infectious Diseases*, 209(6), 876–886. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit569>
- Fraga, T. R., Isaac, L., & Barbosa, A. S. (2016). Complement evasion by pathogenic *Leptospira*. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 7, Issue DEC). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00623>
- Ge, Y.-M., Sun, A.-H., Ojcius, D. M., Li, S.-J., Hu, W.-L., Lin, ai, & Yan, J. (2020). M16-type metallopeptidases are involved in virulence for invasiveness and diffusion of *Leptospira interrogans* and transmission of leptospirosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 179. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa176/5818523>
- Gonzalez A, Rodriguez y, Batista N, Valdes y, G. M. (2003). Caracterización microbiológica de cepas candidatas vacunales de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 55(3), 146–152.
- González Rodríguez, A., Yoandra Rodríguez Jiménez, L., Niurka Batista Santiesteban, T., Yolanda Valdés Abreu, T., & Marta González González, L. (2003). Caracterización microbiológica de cepas candidatas vacunales de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum. *Rev Cubana Med Trop*, 55(3), 146–152.
- Grassmann, A. A., Souza, J. D., & McBride, A. J. A. (2017). A universal vaccine against leptospirosis: Are we going in the right direction? *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00256>
- Guerreiro, H., Croda, J., Flannery, B., Mazel, M., Matsunaga, J., Reis, M. G., Levett, P. N., Ko, A. I., & Haake, D. A. (2001). Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to Leptospirosis in humans. *Infection and Immunity*, 69(8), 4958–

4968. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.8.4958-4968.2001>
- Guglielmini, J., Bourhy, P., Schiettekate, O., Zinini, F., Brisse, S., & Picardeau, M. (2019). Genus-wide *Leptospira* core genome multilocus sequence typing for strain taxonomy and global surveillance. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(4), e0007374. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007374>
- Haake, D. A., Chao, G., Zuerner, R. L., Barnett, J. K., Barnett, D., Mazel, M., Matsunaga, J., Levett, P. N., & Bolin, C. A. (2000). The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 Is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection. *Infection and Immunity*, *68*(4), 2276–2285. <https://doi.org/10.1128/iai.68.4.2276-2285.2000>.
- Haake, D. A., & Levett, P. N. (2015). Leptospirosis in humans. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *387*, 65–97. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_5
- Haake, D. A., Martinich, C., Summers, T. A., Shang, E. S., Pruetz, J. D., Mccoy, A. M., Mazel, M. K., & Bolin, C. A. (1998). Characterization of Leptospiral Outer Membrane Lipoprotein LipL36: Downregulation Associated with Late-Log-Phase Growth and Mammalian Infection. In *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 66, Issue 4).
- Haake, D. A., Mazel, M. K., Mccoy, A. M., Milward, † Frank, Chao, G., Matsunaga, J., & Wagar, E. A. (1999). Leptospiral Outer Membrane Proteins OmpL1 and LipL41 Exhibit Synergistic Immunoprotection. *Infection and Immunity*, *67*(12), 6572–6582.
- Haake, D. A., & Zuckert, W. R. (2014). The leptospiral outer membrane. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *387*, 187–221. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_8
- Haake D. A, Z. W. R. (2018). Spirochetal Lipoproteins in Pathogenesis and Immunity. In B. Adler (Ed.), *Current Topics in Microbiology and Immunology- Spirochete Biology* (pp. 239–271). Springer International.
- Hartskeer, R. A., & Smythe, L. D. (2015). The role of leptospirosis reference laboratories. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *387*, 273–288. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_11
- Harvey, K. L., Jarocki, V. M., Charles, I. G., & Djordjevic, S. P. (2019). The diverse functional roles of elongation factor tu (Ef-tu) in microbial pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, *10*(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02351>
- Hashimoto, V. L., Abreu, P. A. E., Carvalho, E., Gonçales, A. P., Morais, Z. M., Vasconcellos, S. A., Romero, E. C., & Ho, P. L. (2013). Evaluation of the elastinolytic activity and protective effect of Leptallo I, a protein composed by metalloprotease and

- FA5/8C domains, from *Leptospira interrogans* Copenhageni. *Microbial Pathogenesis*, 61–62, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2013.04.011>
- Humphryes, P. C., Weeks, M. E., & Coldham, N. G. (2014). Characterisation of the Proteome of *Leptospira interrogans* Serovar Canicola as a Resource for the Identification of Common Serovar Immunogenic Proteins. *International Journal of Proteomics*, 2014, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2014/572901>
- ICA. (2019). *Boletín Sanidad Animal* 2016.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik. (2001). The structure of a typical antibody molecule. In *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. (5th ed.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27144/#:~:text=Each immunoglobulin molecule is made,chains%2C never one of each>.
- Jeffery, C. J. (2018). Protein moonlighting: What is it, and why is it important? In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 373, Issue 1738). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0523>
- Jobbins, S. E., & Alexander, K. A. (2015). Evidence of *Leptospira* sp. infection among a diversity of African wildlife species: Beyond the usual suspects. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 109(5), 349–351. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trv007>
- Jung, L. R. C., Bomfim, M. R. Q., Kroon, E. G., & Nunes, Á. C. (2015). Identification of *Leptospira* serovars by RFLP of the RNA polymerase beta subunit gene (rpoB). *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 465–476. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220120018>
- Kassegne, K., Hu, W., Ojcius, D. M., Sun, D., Ge, Y., Zhao, J., Yang, X. F., Li, L., & Yan, J. (2014). Identification of collagenase as a critical virulence factor for invasiveness and transmission of pathogenic leptospira species. *Journal of Infectious Diseases*, 209(7), 1105–1115. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit659>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2018). *MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets*. 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lata, K. S., Kumar, S., Vaghasia, V., Sharma, P., Bhairappanvar, S. B., Soni, S., & Das, J. (2018). Exploring Leptospiral proteomes to identify potential candidates for vaccine design against Leptospirosis using an immunoinformatics approach. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25281-3>
- Lata, K. S., Vaghasia, V., Bhairappanvar, S., Patel, S., & Das, J. (2020). Vaccine Design

- Against Leptospirosis Using an Immunoinformatic Approach. In N. Tomar (Ed.), *Immunoinformatics* (Springer Protocols, Vol. 2131). Humana.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0389-5_7
- Lauretti-Ferreira, F., Silva, P. L. D., Alcântara, N. M., Silva, B. F., Grabher, I., Souza, G. O., Nakajima, E., Akamatsu, M. A., Vasconcellos, S. A., Abreu, P. A. E., Carvalho, E., Martins, E. A. L., Ho, P. L., & da Silva, J. B. (2020). New strategies for *Leptospira* vaccine development based on LPS removal. *PLoS ONE*, *15*(3).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230460>
- Laursen, B. S. (2004). The N-terminal domain (IF2N) of bacterial translation initiation factor IF2 is connected to the conserved C-terminal domains by a flexible linker. *Protein Science*, *13*(1), 230–239. <https://doi.org/10.1110/ps.03337604>
- Lee, J.-I., & Kim, I.-H. (2007). Pregnancy loss in dairy cow: The contributing factors, the effects on reproductive performance and the economic impact. *Journal of Veterinary Science*, *8*(3), 283–288.
- Lee, S. H., Kim, S., Park, S. C., & Kim, M. J. (2002). Cytotoxic activities of *Leptospira interrogans* hemolysin SphH as a pore-forming protein on mammalian cells. *Infection and Immunity*, *70*(1), 315–322. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.1.315-322.2002>
- Lessa-Aquino, C., Wunder, E. A., Lindow, J. C., Rodrigues, C. B., Pablo, J., Nakajima, R., Jasinskas, A., Liang, L., Reis, M. G., Ko, A. I., Medeiros, M. A., & Felgner, P. L. (2015). Proteomic features predict seroreactivity against leptospiral antigens in leptospirosis patients. *Journal of Proteome Research*, *14*(1), 549–556.
<https://doi.org/10.1021/pr500718t>
- Levett, P. (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, *14*(2), 296–326.
<https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>
- Levett, P. N. (2015). Systematics of leptospiraceae. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *387*, 11–20. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_2
- Lo, M., Bulach, D. M., Powell, D. R., Haake, D. A., Matsunaga, J., Paustian, M. L., Zuerner, R. L., & Adler, B. (2006). Effects of temperature on gene expression patterns in *Leptospira interrogans* serovar lai as assessed by whole-genome microarrays. *Infection and Immunity*, *74*(10), 5848–5859. <https://doi.org/10.1128/IAI.00755-06>
- Madanan, M. G., & Mechoor, A. (2017). Detection and characterization of bacterial proteinases using zymography. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1626, pp. 103–114). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7111-4_9
- Madathiparambil, M. G., Cattavarayane, S., Manickam, G. D., Singh, K., Perumana, S. R.,

- & Sehgal, S. C. (2011). A zymography analysis of proteinase activity present in *Leptospira*. *Current Microbiology*, *62*(3), 917–922. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9810-3>
- Maneewatch, S., Sakolvaree, Y., Saengjaruk, P., Srimanote, P., Tapchaisri, P., Tongtawe, P., Klaysing, B., Wongratanacheewin, S., Chongsa-Nguan, M., & Chaicumpa, W. (2008). Monoclonal Antibodies to LipL32 Protect Against Heterologous *Leptospira* spp. Challenge. *Hybridoma*, *27*(6), 453–465. <https://doi.org/https://doi.org/10.1089/hyb.2008.0056>
- Mateus, J., Gómez, N., Herrera-Sepúlveda, M. T., Hidalgo, M., Pérez-Torres, J., & Cuervo, C. (2019). Bats are a potential reservoir of pathogenic leptospira species in Colombia. *Journal of Infection in Developing Countries*, *13*(4), 278–283. <https://doi.org/10.3855/jidc.10642>
- Matsunaga, J., Young, T. A., Barnett, J. K., Barnett, D., Bolin, C. A., & Haake, D. A. (2002). Novel 45-kilodalton leptospiral protein that is processed to a 31-kilodalton growth-phase-regulated peripheral membrane protein. *Infection and Immunity*, *70*(1), 323–334. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.1.323-334.2002>
- Matsuo, K., Isogai, E., & Araki, Y. (2000). Control of immunologically crossreactive leptospiral infection by administration of lipopolysaccharides from a nonpathogenic strain of *Leptospira biflexa*. *Microbiology and Immunology*, *44*(11), 887–890. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2000.tb02579.x>
- Merien, F., Amouriaux, P., Perolat, P., & Baranton, G. (1992). Polymerase Chain Reaction for Detection of *Leptospira* spp. in Clinical Samples. In *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*.
- Mgode, G. F., Mhamphi, G. G., Katakweba, A. S., & Thomas, M. (2014). *Leptospira* infections in freshwater fish in Morogoro Tanzania: A hidden public health threat. *Tanzania Journal of Health Research*, *16*(2). <https://doi.org/10.4314/thrb.v16i2.7>
- Mohammed, H., Nozha, C., Hakim, K., & Abdelaziz, F. (2011). LEPTOSPIRA: Morphology, Classification and Pathogenesis. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, *02*(06). <https://doi.org/10.4172/2155-9597.1000120>
- Morey, R. E., Galloway, R. L., Bragg, S. L., Steigerwalt, A. G., Mayer, L. W., & Levett, P. N. (2006). Species-specific identification of *Leptospiraceae* by 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(10), 3510–3516. <https://doi.org/10.1128/JCM.00670-06>
- Murray, G. L., Lo, M., Bulach, D. M., Srikram, A., Seemann, T., Quinsey, N. S., Sermswan,

- R. W., Allen, A., & Adler, B. (2013). Evaluation of 238 antigens of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo for protection against kidney colonisation. *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.028>
- Murray, G. L., Simawaranon, T., Kaewraemruaen, C., Adler, B., & Sermswan, R. W. (2018). Heterologous protection elicited by a live, attenuated, *Leptospira* vaccine. *Veterinary Microbiology*, 223, 47–50. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.07.018>
- Narayanavari, S. A., Sritharan, M., Haake, D. A., & Matsunaga, J. (2012). Multiple leptospiral sphingomyelinases (or are there?). In *Microbiology* (Vol. 158, Issue 5, pp. 1137–1146). <https://doi.org/10.1099/mic.0.057737-0>
- Nascimento, E. G., Vieira, M. L., Teixeira, A. F., Santos, J. C., Fernandes, L. G. V., Passalia, F. J., Daroz, B. B., Rossini, A., Kochi, L. T., Cavenague, M. F., Pimenta, D. C., & Nascimento, A. L. T. O. (2018). *Proteomics as a tool to understand Leptospira physiology and virulence : Recent advances , challenges and clinical implications*. Journal of Proteomics; Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.02.025>
- Nogueira, S. V., Backstedt, B. T., Smith, A. A., Qin, J. H., Wunder, E. A., Ko, A., & Pal, U. (2013). *Leptospira interrogans* Enolase Is Secreted Extracellularly and Interacts with Plasminogen. *PLoS ONE*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078150>
- Odir, A. D., Grassmann, A. A., Hartwig, D. D., Félix, S. R., Da Silva, É. F., & McBride, A. J. A. (2011). Recombinant vaccines against leptospirosis. In *Human Vaccines* (Vol. 7, Issue 11, pp. 1215–1224). <https://doi.org/10.4161/hv.7.11.17944>
- OIE. (2018). Leptospirosis. In OIE (Ed.), *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres* (8a Edición, pp. 1–16).
- Orozco Vega, L. E., López Flores, R., Moles Cervantes, L., & Quiroz Valiente, J. (2005). Evaluación de una bacterina homóloga contra la leptospirosis bovina. *REV CUBANA MED TROP*, 57(1), 38–42.
- Page, M., & Thorpe, R. (2002). *Purification of IgG Using Caprylic Acid*.
- Patra, K. P., Choudhury, B., Matthias, M. M., Baga, S., Bandyopadhyay, K., & Vinetz, J. M. (2015). Comparative analysis of lipopolysaccharides of pathogenic and intermediately pathogenic *Leptospira* species. *BMC Microbiology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0581-7>
- Pavan, M. E., Cairó, F., Pettinari, M. J., Samartino, L., & Brihuega, B. (2011). Genotyping of *Leptospira interrogans* strains from Argentina by Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Analysis (MLVA). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34(2), 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2010.06.002>

- Pérez-García, J., Agudelo-Flórez, P., Parra-Henao, G. J., Ochoa, J. E., & Arboleda, M. (2019). Incidence and under-registration of leptospirosis between three diagnosis methods in an endemic region, Urabá, Colombia. *Biomedica*, 39. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i0.4577>
- Petrakovsky, J., Bianchi, A., Fisun, H., Nájera-aguilar, P., & Pereira, M. M. (2014). *Animal Leptospirosis in Latin America and the Caribbean Countries : Reported Outbreaks and Literature Review*. 10770–10789. <https://doi.org/10.3390/ijerph111010770>
- Picardeau, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. In *Medecine et Maladies Infectieuses* (Vol. 43, Issue 1, pp. 1–9). <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.11.005>
- Picardeau, Mathieu. (2015). Genomics, proteomics, and genetics of leptospira. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387, 43–63. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_4
- Picardeau, Mathieu. (2017). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: Still terra incognita? In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 15, Issue 5, pp. 297–307). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5>
- Picardeau, Mathieu, Bulach, D. M., Bouchier, C., Zuerner, R. L., Zidane, N., Wilson, P. J., Creno, S., Kuczek, E. S., Bommezzadri, S., Davis, J. C., McGrath, A., Johnson, M. J., Boursaux-Eude, C., Seemann, T., Rouy, Z., Coppel, R. L., Rood, J. I., Lajus, A., Davies, J. K., ... Adler, B. (2008). Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS ONE*, 3(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001607>
- Pinne, M., & Haake, D. A. (2009). A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of *Leptospira interrogans*. *PLoS ONE*, 4(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006071>
- Raja, V., & Natarajaseenivasan, K. (2015). Pathogenic, diagnostic and vaccine potential of leptospiral outer membrane proteins (OMPs). *Critical Reviews in Microbiology*, 41(1), 1–17. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.787387>
- Ren, S.-X., Fu, G., Jiang, X.-G., Zeng, R., Miao, Y.-G., Xu, H., Zhang, Y.-X., Xiong, H., Lu, G., Lu, L.-F., Jiang, H.-Q., Jia, J., Tu, Y.-F., Jiang, J.-X., Gu, W.-Y., Zhang, Y.-Q., Cai, Z., Sheng, H.-H., Yin, H.-F., ... Zhao, G.-P. (2003). Unique Physiological and Pathogenic Features of *Leptospira Interrogans* Revealed by Whole-Genome Sequencing. *Nature*, 422(6934), 888-893. <https://doi.org/10.1038/nature01597>
- Ricaldi, J. N., Fouts, D. E., Selengut, J. D., Harkins, D. M., Patra, K. P., Moreno, A.,

- Lehmann, J. S., Purushe, J., Sanka, R., Torres, M., Webster, N. J., Vinetz, J. M., & Matthias, M. A. (2012). Whole Genome Analysis of *Leptospira licerasiae* Provides Insight into Leptospiral Evolution and Pathogenicity. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001853>
- Romero-Vivas, C. M. E., Cuello-Pérez, M., Agudelo-Flórez, P., Thiry, D., Levett, P. N., & Falconar, A. K. I. (2013). Cross-sectional study of *Leptospira* seroprevalence in humans, rats, mice, and dogs in a main tropical sea-port city. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(1), 178–183. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0232>
- Romero-Vivas, C. M., Thiry, D., Rodríguez, V., Calderón, A., Arrieta, G., Máttar, S., Cuello, M., Levett, P. N., & Falconar, A. K. (2013). Molecular serovar characterization of *Leptospira* isolates from animals and water in Colombia. *Biomedica*, 33(SUPPL.1), 179–184. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.731>
- Romero JR, Villamil J, & Pinto JA. (1999). Impacto económico de enfermedades animales en sistemas productivos en Sudamérica: estudios de caso. *Scientific and Technical Review of the Office International Des Epizooties*, 18(2), 498–511.
- Rosario, L. A., Arencibia, D. F., Suarez, Y. E., Infante, J. F., Valdés, B. Y., & Batista, N. (2012). Cross-protection among unrelated *Leptospira* pathogens serovars: An unfinished story. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 21(5), 581–589.
- Sakolvaree, Y., Maneewatch, S., Jiemsup, S., Klaysing, B., Tongtawe, P., Srimanote, P., Saengjaruk, P., Banyen, S., Tapchaisri, P., Chonsa-Nguan, M., & Chaicumpa, W. (2007). Proteome and Immunome of Pathogenic *Leptospira* spp. Revealed by 2DE and 2DE-Immunoblotting with Immune Serum. *Asian Pacific Journal Of Allergy And Immunology*, 25, 53–73.
- Salazar, N., & Barbosa, A. (2017). Unexpected Interactions of Leptospiral Ef-Tu and Enolase. In *Moonlighting Proteins: Novel Virulence Factors in Bacterial Infections* (pp. 351–356). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118951149.ch19>
- Samaha, T. H. (2019). Leptospiral phosphatidylinositol-specific phospholipase C: a novel conserved antigen for the definitive diagnosis of Leptospirosis. *Molecular Biology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04726-6>
- Sánchez, E. C., Gutiérrez, B., Fernández, C. L., & Arias, J. P. (2007). PRODUCCIÓN Y EVALUACIÓN SEROLÓGICA DE UNA BACTERINA CONTRA LA LEPTOSPIROSIS BOVINA PRODUCTION AND SEROLOGIC EVALUATION OF A BACTERIN AGAINST BOVINE LEPTOSPIROSIS. In *Rev.MVZ Córdoba* (Vol. 12, Issue 2).

- Sánchez, R. G. P., Quintero, J. Á. L., Pereira, M. M., & Agudelo-Flórez, P. (2017). High-resolution melting curve analysis of the 16s ribosomal gene to detect and identify pathogenic and saprophytic leptospira species in colombian isolates. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *96*(5), 1031–1038.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0312>
- Schmidt, A., Beck, M., Malmström, J., Lam, H., Claassen, M., Campbell, D., & Aebersold, R. (2011). Absolute quantification of microbial proteomes at different states by directed mass spectrometry. *Molecular Systems Biology*, *7*.
<https://doi.org/10.1038/msb.2011.37>
- Scola, B. La, Bui, L. T. M., Baranton, G., Khamis, A., & Raoult, D. (2006). Partial rpoB gene sequencing for identification of Leptospira species. *FEMS Microbiology Letters*, *263*(2), 142–147. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00377.x>
- Seixas, F. K., da Silva, É. F., Hartwig, D. D., Cerqueira, G. M., Amaral, M., Fagundes, M. Q., Dossa, R. G., & Dellagostin, O. A. (2007). Recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing the LipL32 antigen of Leptospira interrogans protects hamsters from challenge. *Vaccine*, *26*(1), 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.10.052>
- Shang, E. S., Exner, M. M., Summers, T. A., Martinich, C., Champion, C. I., Hancock, R. E. W., & Haake, D. A. (1995). The Rare Outer Membrane Protein, OmpL1, of Pathogenic Leptospira Species Is a Heat-Modifiable Porin. In *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 63, Issue 8).
- Silveira, M. M., Oliveira, T. L., Schuch, R. A., McBride, A. J. A., Dellagostin, O. A., & Hartwig, D. D. (2017). DNA vaccines against leptospirosis: A literature review. In *Vaccine* (Vol. 35, Issue 42, pp. 5559–5567). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.08.067>
- Slack, A. T., Symonds, M. L., Dohnt, M. F., & Smythe, L. D. (2006). Identification of pathogenic Leptospira species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiology*, *6*.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-95>
- Smythe, L. D., Wuthiekanun, V., Chierakul, W., Suputtamongkol, Y., Tiengrim, S., Dohnt, M. F., Symonds, M. L., Slack, A. T., Apiwattanaporn, A., Chueasuwanchai, S., Day, N. P., & Peacock, S. J. (2009). Short report: The microscopic agglutination test (MAT) is an unreliable predictor of infecting Leptospira serovar in Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *81*(4), 695–697.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.09-0252>

- Sonada, R. B., Azevedo, S. S. de, Soto, F. R. M., Costa, D. F. da, Morais, Z. M. de, Souza, G. O. de, Gonçalves, A. P., Miraglia, F., & Vasconcellos, S. A. (2018). Efficacy of leptospiral commercial vaccines on the protection against an autochthonous strain recovered in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, *49*(2), 347–350. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.06.008>
- Sonrier, C., Branger, C., Michel, V., Ruvoè N-Clouet, N., Ganieá, J. P., & Andréa - Fontaine, G. (2001). Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. *Vaccine*, *19*, 84–94. www.elsevier.com/locate/vaccine
- Srikram, A., Zhang, K., Bartpho, T., Lo, M., Hoke, D. E., Sermswan, R. W., Adler, B., & Murray, G. L. (2011). Cross-protective immunity against leptospirosis elicited by a live, attenuated lipopolysaccharide mutant. *Journal of Infectious Diseases*, *203*(6), 870–879. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq127>
- Stucky, B. J. (2012). Seqtrace: A graphical tool for rapidly processing DNA sequencing chromatograms. *Journal of Biomolecular Techniques*, *23*(3), 90–93. <https://doi.org/10.7171/jbt.12-2303-004>
- Thibeaux, R., Iraola, G., Ferrés, I., Bierque, E., Girault, D., Soupé-Gilbert, M. E., Picardeau, M., & Goarant, C. (2018). Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. *Microbial Genomics*, *4*(1). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000144>
- Thongboonkerd, V. (2008). Proteomics in leptospirosis research: Towards molecular diagnostics and vaccine development. In *Expert Review of Molecular Diagnostics* (Vol. 8, Issue 1, pp. 53–61). <https://doi.org/10.1586/14737159.8.1.53>
- Thongboonkerd, V., Chiangjong, W., Saetun, P., Sinchaikul, S., Chen, S. T., & Kositanont, U. (2009). Analysis of differential proteomes in pathogenic and non-pathogenic *Leptospira*: Potential pathogenic and virulence factors. *Proteomics*, *9*(13), 3522–3534. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700855>
- Torgerson, P. R., Hagan, J. E., Costa, F., Calcagno, J., Kane, M., Martinez-Silveira, M., Goris, M., Stein, C., Ko, A. I., & Abela-Ridder, B. (2015). Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *9*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004122>
- Turner, L. (1970). Maintenance, isolation and demonstration of leptospire. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *64*(4), 623–646.
- Vecol S.A. (2018a). *Proyecto Piloto de Excelencia Sanitaria en Ganadería Bovina de Carne*. <https://vecol.com.co/wp-content/uploads/2020/09/PROYECTOS-DE->

EXCELENCIA-SANITARIA-CARNE.pdf

- Vecol S.A. (2018b). *Proyecto Piloto de Excelencia Sanitaria en Ganadería Bovina de Leche*. <https://vecol.com.co/wp-content/uploads/2020/09/PROYECTOS-DE-EXCELENCIA-SANITARIA-GANADERIA-LECHE.pdf>
- Verma, A., Artiushin, S., Matsunaga, J., Haake, D. A., & Timoney, J. F. (2005). LruA and LruB, novel lipoproteins of pathogenic *Leptospira interrogans* associated with equine recurrent uveitis. *Infection and Immunity*, *73*(11), 7259–7266. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.11.7259-7266.2005>
- Vernel-Pauillac, F., & Werts, C. (2018). Recent findings related to immune responses against leptospirosis and novel strategies to prevent infection. *Microbes and Infection*, *20*(9–10), 578–588. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.02.001>
- Vieira, M. L., de Moraes, Z. M., Gonçalves, A. P., Romero, E. C., Vasconcellos, S. A., & Nascimento, A. L. T. O. (2010). Lsa63, a newly identified surface protein of *Leptospira interrogans* binds laminin and collagen IV. *Journal of Infection*, *60*(1), 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2009.10.047>
- Vieira, M. L., Pimenta, D. C., De Moraes, Z. M., Vasconcellos, S. A., & Nascimento, A. L. T. O. (2009). Proteome Analysis of *Leptospira interrogans* Virulent Strain. In *The Open Microbiology Journal* (Vol. 3). <http://cmr.jcvi.org/cgi-bin/>
- Vijayachari, P., Vedhagiri, K., Mallilankaraman, K., Mathur, P. P., Sardesai, N. Y., Weiner, D. B., Ugen, K. E., & Muthumani, K. (2015). Immunogenicity of a novel enhanced consensus DNA vaccine encoding the leptospiral protein LipL45. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, *11*(8), 1945–1953. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1047117>
- Vincent, A. T., Schiettekatte, O., Goarant, C., Neela, V. K., Bernet, E., Thibeaux, R., Ismail, N., Khalid, M. K. N. M., Amran, F., Masuzawa, T., Nakao, R., Korba, A. A., Bourhy, P., Veyrier, F. J., & Picardeau, M. (2019). Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>
- Vinod Kumar, K., Lall, C., Vimal Raj, R., Vedhagiri, K., Kartick, C., Surya, P., Natarajaseenivasan, K., & Vijayachari, P. (2017). Overexpression of heat shock GroEL stress protein in leptospiral biofilm. *Microbial Pathogenesis*, *102*, 8–11. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.11.010>
- Waggoner, J. J., & Pinsky, B. A. (2016). Molecular diagnostics for human leptospirosis. In

- Current Opinion in Infectious Diseases* (Vol. 29, Issue 5, pp. 440–445). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000295>
- Werts, C. (2018). Interaction of leptospira with the innate immune system. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 415, pp. 163–187). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/82_2017_46
- Widjaja, M., Harvey, K. L., Hagemann, L., Berry, I. J., Jarocki, V. M., Raymond, B. B. A., Tacchi, J. L., Gründel, A., Steele, J. R., Padula, M. P., Charles, I. G., Dumke, R., & Djordjevic, S. P. (2017). Elongation factor Tu is a multifunctional and processed moonlighting protein. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10644-z>
- Zeng, L. B., Zhuang, X. R., Huang, L. L., Zhang, Y. Y., Chen, C. Y., Dong, K., Zhang, Y., Cui, Z. L., Ding, X. L., Chang, Y. F., Guo, X. K., & Zhu, Y. Z. (2015). Comparative subproteome analysis of three representative *Leptospira interrogans* vaccine strains reveals cross-reactive antigens and novel virulence determinants. *Journal of Proteomics*, 112. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.08.015>
- Zeng, L., Zhang, Y., Zhu, Y., Yin, H., Zhuang, X., Zhu, W., Guo, X., & Qin, J. (2013). Extracellular Proteome Analysis of *Leptospira interrogans* serovar Lai. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 17(10), 527–535. <https://doi.org/10.1089/omi.2013.0043>
- Zhang, Y.-X., Geng, Y., Yang, J.-W., Guo, X.-K., & Zhao, G.-P. (2008). Cytotoxic activity and probable apoptotic effect of Sph2, a sphingomyelinase hemolysin from *Leptospira interrogans* strain Lai. *BMB Reports*, 41(2), 119–125. <http://bmbreports.org>
- Zhang, Y. X., Geng, Y., Bi, B., He, J. Y., Wu, C. F., Guo, X. K., & Zhao, G. P. (2005). Identification and classification of all potential hemolysin encoding genes and their products from *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae serovar Lai. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26(4), 453–461. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00075.x>
- Zuluaga, A. (2009). Factores de riesgo asociados a Leptospirosis en hatos bovinos de Pereira 2002 - 2005. *Investigaciones Andina*, 11(19), 108–117.

ANEXOS

Anexo 1. Aislamientos pertenecientes a la CMISA

Referencia CMISA	Departamento	Municipio	Hospedero	Muestra biológica
Lep031	Cundinamarca	Cundinamarca	Bovino	Riñon
Lep032	Cundinamarca	Cundinamarca	Bovino	Riñon
Lep033	Cundinamarca	Cundinamarca	Cerdo	Feto
Lep034	Cundinamarca	Cundinamarca	Cerdo	Feto
Lep035	Cundinamarca	Cundinamarca	Cerdo	Feto
Lep036	Cundinamarca	Cundinamarca	Cerdo	Feto
Lep037	Cundinamarca	Cundinamarca	Bovino	Feto
Lep038	Cundinamarca	Cundinamarca	Bovino	Feto
Lep039	Cundinamarca	Cundinamarca	Bovino	Feto
Lep040	Cundinamarca	Cundinamarca	Humano	orina
Lep041	Risaralda	Combia	Humano	orina
Lep042	Risaralda	Combia	Humano	orina
Lep043	Quindio	Circasia	Humano	orina
Lep044	Quindio	Circasia	Humano	orina
Lep045	Caldas	Chinchina	Humano	orina
Lep046	Caldas	Villa Maria	Cerdo	orina
Lep047	Caldas	Manizales	Cerdo	Higado
Lep048	Caldas	Manizales	Cerdo	orina
Lep049	Quindio	Circasia	Cerdo	Pulmon
Lep050	Caldas	Manizales	Cerdo	Higado
Lep051	Caldas	Manizales	Cerdo	Pulmon
Lep052	Caldas	Manizales	Cerdo	Pulmon
Lep053	Caldas	Palestina	Cerdo	orina
Lep054	Risaralda	Pereira	Canino	orina
Lep055	Caldas	Chinchina	Roedor	Higado
Lep056	Caldas	Chinchina	Roedor	Higado
Lep057	Quindio	Circasia	Roedor	Higado
Lep058	Caldas	Circasia	Roedor	Riñon
Lep059	Quindio	Circasia	Roedor	Pulmon
Lep060	Quindio	Circasia	Roedor	Riñon
Lep061	Risaralda	Pereira	Roedor	Higado
Lep062	Quindio	Circasia	Agua Chupon gestante	Agua

Lep063	Quindio	Circasia	Agua de tanque	Agua
Lep064	Risaralda	Combia	Tanque de almacenamiento	Agua
Lep065	Risaralda	Combia	Tanque de almacenamiento	Agua
Lep066	Risaralda	Combia	Tanque de lavado	Agua
Lep067	Risaralda	Combia	Tanque de lavado	Agua
Lep068	Risaralda	Santa Rosa De Cabal	Agua residual	Agua
Lep069	Risaralda	Santa Rosa De Cabal	Agua residual	Agua
Lep070	Risaralda	Santa Rosa De Cabal	Agua residual	Agua
Lep071	Caldas	Villa Maria	Agua nacimiento	Agua
Lep072	Caldas	Chinchina	Tanque de almacenamiento	Agua
Lep073	Caldas	Palestina	Pozo superficial	Agua
Lep074	Caldas	Circasia	Agua Chupon gestante	Agua
Lep075	Caldas	Manizales	Tanque de almacenamiento	Agua
Lep076	Quindio	Circasia	Agua Chupon gestante	Agua
Lep077	Quindio	Circasia	Tanque de almacenamiento	Agua
Lep078	Quindio	Circasia	Tanque de almacenamiento	Agua
Lep079	Risaralda	Combia	Agua residual	Agua
Lep080	Nariño	Sapuyes	Bovino	Riñon
Lep081	Nariño	Túquerres	Bovino	Riñon
Lep091	Meta	Guamal	Bovino	Riñon
Lep092	Cundinamarca	Lenguazaque	Bovino	orina
Lep093	Cundinamarca	Zipaquira	Bovino	Riñon
Lep094	Meta	Castilla La Nueva	Bovino	orina

Anexo 2. Información de las vacunas usadas en la inmunización de ratones

No.	Vacuna	Laboratorio	Especies	Composición
1	Bovisan® LEPTO 8	Virbac	Bovinos, ovinos y porcinos.	<i>Leptospira interrogans</i> serovares Canicola, Grippotyphosa, Hardjo tipo Hardjoprajtino, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Tarassovi, Wolffy, <i>Leptospira borgpetersenii</i> serovar Hardjo tipo Hardjobovis.

2	Blindagán®	Vecol	Bovinos	Virus de IBR (Rinotraqueitis Infecciosa Bovina), DVB (Diarrea Viral Bovina – virus Citopático y no Citopático), Parinfluenza tipo 3 (PI3), virus Respiratorio Sincytial Bovino (VRSB) y Leptospira (siete serovares: Pomona, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Hardjo, Tarassovi, Grippotyphosa y Bratislava) y dos serovares de <i>Campylobacter</i> .
---	------------	-------	---------	--

Anexo 3. Resultados datos crudos espectrofotometría de masas

Punto 2-DE	-10lgP	Coverage (%)	Area Sample 1	# Peptides	# Unique	#Spec Sample 1	PTM	Avg. Mass	Description
1	100.80	5	2.18E6	2	2	4	Y	43574	Elongation factor Tu OS=Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae serovar Lai (strain 56601) OX=189518 GN=tuf PE=3 SV=1
	71.82	2	1.21E5	1	1	1	N	97208	Translation initiation factor IF-2 OS=Leptospira biflexa serovar Patoc (strain Patoc 1 / Ames) OX=355278 GN=infB PE=3 SV=1
2	73.21	2	2.15E5	1	1	1	N	97208	Translation initiation factor IF-2 OS=Leptospira biflexa serovar Patoc (strain Patoc 1 / Ames) OX=355278 GN=infB PE=3 SV=1
	62.84	2	2.6E5	1	1	1	N	43574	Elongation factor Tu OS=Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae serovar Lai (strain 56601) OX=189518 GN=tuf PE=3 SV=1
3	142.46	12	3.08E6	4	4	5	N	43574	Elongation factor Tu OS=Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae serovar Lai (strain 56601) OX=189518 GN=tuf PE=3 SV=1
	81.09	2	1.57E6	1	1	2	N	97208	Translation initiation factor IF-2 OS=Leptospira biflexa serovar Patoc (strain Patoc 1 / Ames)

									OX=355278 GN=infB PE=3 SV=1
4	238.87	19	1.9E7	7	7	17	Y	43574	Elongation factor Tu OS=Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae serovar Lai (strain 56601) OX=189518 GN=tuf PE=3 SV=1
	60.54	4	3.87E4	2	2	8	N	46736	Enolase OS=Leptospira biflexa serovar Patoc (strain Patoc 1 / Ames) OX=355278 GN=eno PE=3 SV=1
5	233.54	30	4.73E7	10	10	31	Y	43574	Elongation factor Tu OS=Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae serovar Lai (strain 56601) OX=189518 GN=tuf PE=3 SV=1