



UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCENCIAS

BIOPROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE UN
VECTOR DE ADN PLASMÍDICO DE USO
POTENCIAL COMO VACUNA CONTRA
LEPTOSPIROSIS EN SONORA

T E S I S

que para obtener el grado de :

MAESTRO EN BIOCENCIAS

presenta:

EDGAR SANDOVAL PETRIS

Hermosillo, Sonora, México.

Diciembre del 2010.

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



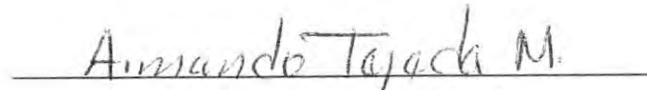
**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



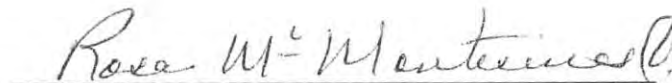
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

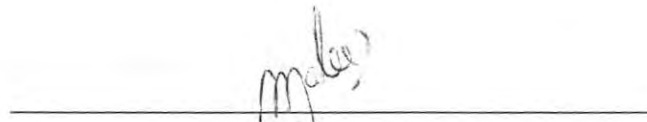
Los miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada “Bioproceso para la obtención de un vector de ADN plasmídico de uso potencial como vacuna contra Leptospirosis en Sonora”, presentada por Edgar Sandoval Petris, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias.



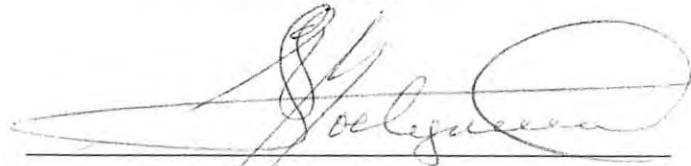
Dr. Armando Tejeda Mansir
Director



Dra. Rosa María Montesinos Cisneros
Sinodal



M. en C. Magali Avilés Acosta
Sinodal



Dr. Alejandro de la Peña-Moctezuma
Sinodal

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mi familia (Mary, Tita, Licha, hermanos y padres) quienes son mi motivación para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor Dr. Armando Tejeda, quien confió en mí para desarrollar mi trabajo de tesis bajo su asesoría.

A la Universidad de Sonora y en especial al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, que me brindó la oportunidad de seguir superándome a través de su posgrado en Biociencias.

A CONACYT, por otorgarme el apoyo económico para realizar estudios de posgrado.

Al Laboratorio Estatal de Salud Pública de Sonora y en particular a los químicos Román Escobar y Alberto Cons, que colaboraron con las instalaciones, material y asesoría que se requirió en una parte del proyecto.

A mis sinodales Dra. Rosa María Montesinos, M. en C. Magali Aviles y Dr. Alejandro de la Peña, quienes me asesoraron y aportaron valiosos comentarios durante la realización del proyecto.

A Gerardo Reséndiz y Alexel Burgara, quienes me apoyaron con su experiencia en técnicas de biología molecular.

A los Doctores Manuel Grijalva (DICTUS), Jaime Ortega (CINVESTAV) y Jesús Hernández (CIAD), por facilitarme el acceso y trabajo en sus respectivos laboratorios.

En especial a Maricela, por estar ahí en las buenas, en las malas y en las peores.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABLAS	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
I INTRODUCCIÓN	1
II ANTECEDENTES	2
2.1 Leptospirosis.....	2
2.2 Agente etiológico	2
2.3 Epidemiología	5
2.4 Prevención	6
2.5 Tipos de vacunas	8
2.6 Producción de vacunas de ADNp	11
2.6.1 Selección del gen de interés	12
2.6.2 Selección del vector de expresión	12
2.6.3 Selección y reproducción de la célula hospedara	13
2.6.4 Recuperación del plásmido.....	19
III HIPÓTESIS	23
IV OBJETIVOS	24
4.1 Objetivo general.....	24
4.2 Objetivos particulares	24
V MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1 Estandarización de la PCR para la detección del gen LipL32 de <i>Leptospira</i>	25
5.1.2 Preparación de las cepas de referencia de <i>Leptospira</i>	26
5.1.3 Muestras clínicas	26
5.1.4 Extracción y purificación de ADN genómico	26
5.1.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del gen LipL32 de <i>Leptospira</i>	27

5.2	Clonación del gen LipL32 en un vector de expresión	28
5.2.1	Digestión enzimática del gen LipL32 y el vector pVAX1	28
5.2.2	Ligado del gen LipL32 en pVAX1	28
5.3	Transformación de <i>E. coli</i> y producción de plásmidos a escala matraz	29
5.3.1	Transformación de células <i>E. coli</i>	30
5.3.2	Selección de colonias transformadas	30
5.3.3	Producción del pVAX1-LipL32 a nivel matraz.....	31
5.3.4	Purificación del plásmido pVAX1-LipL32	31
5.4	Evaluación de la expresión del gen LipL32 en células de mamífero <i>in vitro</i>	32
5.4.1	Transfección del plásmido pVAX1-LipL32 en células MARC 145.....	32
5.4.2	Extracción de ARN con Trizol	33
5.4.3	Obtención de ADNc mediante transcripción reversa (RT).....	33
5.4.4	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	34
VI	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
6.1	Estandarización de la PCR para la detección del gen LipL32 de <i>Leptospira</i>	35
6.2	Clonación del gen LipL32 en un vector de expresión	39
6.3	Producción del plásmido a escala matraz.....	42
6.4	Expresión del gen LipL32 en células de mamífero <i>in vitro</i>	44
VII	CONCLUSIONES.....	51
VIII	RECOMENDACIONES	52
IX	LITERATURA CITADA.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Semejanza del mecanismo de acción entre las vacunas de ADNp y virus vivos (Liu, 2003).....	10
Figura 2. Mapa característico de un vector de expresión utilizado como vacuna de ADNp (Adaptada de (Tejeda-Mansir and Montesinos, 2008).	13
Figura 3. Rendimiento plasmídico de cultivos de <i>Escherichia coli</i> , en matraz.....	15
Figura 4. Rendimiento plasmídico de algunos procesos de fermentación por lote y lote alimentado.	16
Figura 5. Diagrama metodológico.....	25
Figura 6. Mapa del vector plasmídico pVAX1.....	29
Figura 7. Perfil electroforético en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR de la amplificación del gen LipL32 de <i>Leptospira spp.</i> 1) marcador de peso molecular; 9-14) serovariedades: <i>canicola</i> , <i>icterohaemorrhagiae pyrogenes</i> , <i>autumnalis</i> , <i>cynopteri</i> y <i>hardjo</i> , (819pb); 15) control negativo.....	36
Figura 8. Perfil electroforético en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR de un fragmento interno del gen LipL32 de <i>Leptospira spp.</i> 1) marcador de peso molecular; 2-7) serovariedades: <i>canicola</i> , <i>icterohaemorrhagiae</i> , <i>pyrogenes</i> , <i>autumnalis</i> , <i>cynopteri</i> y <i>hardjo</i> (260pb); 8) control negativo.....	37
Figura 9. Perfil electroforético en gel de agarosa al 2% del perfil de restricción del vector pVAX1-LipL32. 1) marcador de peso molecular; 2) gen LipL32; 3) vector pVAX1; 4-7) ligación pVAX1-LipL32; 8-11) digestión del producto de ligación.	39
Figura 10. Alineamiento de la secuencia del plásmido pVAX-LipL32 y distintas secuencias de LipL32 del género <i>Leptospira</i>	41
Figura 11. Cinética de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> cultivada por 8 horas en medio TB. .	43
Figura 12. Cinética de producción de ADN plasmídico.....	44
Figura 13. Perfil electroforético en gel de agarosa 2% de los productos de PCR del ensayo de transfección. La transcripción reversa se realizó empleando el sistema Super Script (Invitrogen). 1) marcador de peso molecular; 2) PCR <i>control positivo</i> (pVAX-LipL32); 3) PCR a partir de ARN Marc <i>sin transfectar</i> ; 4) PCR de ARN de <i>células transfectadas sin ADNasa</i> ; 5) PCR de ARN de <i>células transfectadas, y tratado con ADNasa</i> ; 6) RT-PCR con oligo específico, <i>células transfectadas</i> ; 7) RT-PCR con oligo específico, <i>células sin transfectar</i> ; 8) RT-PCR <i>control negativo</i> (sin templado); 9) plásmido pVAX-LipL32; 10) RT-PCR con oligo dT, <i>células transfectadas</i>	46

Figura 14. Perfil electroforético en gel de agarosa 2% de los productos de RT-PCR del ensayo de transfección. La transcripción reversa fue realizada con el sistema AffinityScript (STRATAGENE). 1) marcador de peso molecular; 2) *control positivo* (pVAX-LipL32); 3) LipL32 con iniciador gen específico Rv; 4) LipL32 con iniciador oligo dT; 5) gen constitutivo GAPDH; 6) control negativo (sin templado)..... 47

Figura 15. Alineamiento de la secuencia del gen LipL32 expresado en células MARC 145 y distintas secuencias del género *Leptospira*..... 49

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de especies de <i>Leptospira</i> (Bharti et al., 2003).	4
Tabla 2. Composición elemental de la bacteria <i>E. coli</i> , peso seco (Carnes, 2005).	17
Tabla 3. Datos clínicos de los pacientes positivos a leptospirosis mediante MAT y PCR.	38
Tabla 4. Matriz de identidad de nucleótidos del gen LipL32 clonado en el vector pVAX-1...	42
Tabla 5. Matriz de porcentajes de identidad nucleotídica del gen LipL32 clonado en el vector pVAX-1.	50

RESÚMEN

Las vacunas que actualmente se utilizan para proteger contra la leptospirosis, ya sea en humanos o animales, están constituidas por bacterias inactivadas y/o atenuadas. Dichas vacunas presentan ciertas desventajas frente a las vacunas de ADN plasmídico. Sin embargo éstas últimas han sido poco probadas contra ésta enfermedad. En este trabajo se implementó un bioproceso capaz de producir un plásmido con potencial de usarse como vacuna contra leptospirosis. Se logró estandarizar una técnica de PCR capaz de detectar la presencia de leptospira en 6 cepas de referencia. Mediante esta técnica se analizaron 34 sueros de humanos para diagnóstico de leptospirosis, de los cuales 10 resultaron positivos (29.4%). El gen LipL32 fue clonado en el plásmido pVAX1, con el cual se transformó *Escherichia coli* DH5 α . La propagación del plásmido se realizó a nivel matraz obteniéndose una concentración máxima de plásmido de 80 mg/L, en un periodo de incubación de 6 h. El plásmido obtenido fue purificado y utilizado para transfectar células de mamífero para verificar la transcripción (ARNm) del gen LipL32. Se obtuvo la secuencia de ADNc de dicho transcrito y se amplificó con iniciadores específicos. El amplicon fue secuenciado y comparado con otras secuencias de la bacteria publicadas en bases de datos en línea; se observó una identidad de nucleótidos mayor al 94%. Los resultados sugieren que el bioproceso desarrollado en este trabajo permite la producción de un plásmido con uso potencial como vacuna contra leptospirosis.

ABSTRACT

The vaccines currently in use to protect against leptospirosis in humans or animals are formed of inactivated bacteria and / or attenuated. These vaccines have certain disadvantages compared to plasmid DNA vaccines. However, DNA vaccines have been limited tested against the disease. In this work, a bioprocess to obtain a plasmid with potential use as a vaccine against leptospirosis was developed. A PCR technique was standardized to detect the gene LipL32 in 6 reference strains. Using this technique 34 serological human samples were tested and 10 result positive to leptospirosis (29.4%). The Lip32 gen was cloned in the pVAX1 plasmid, which was used to transform *Escherichia coli* DH5 α cells. Plasmid propagation was carried out at shake flask level. An 80 mg/L plasmid concentration was attained in a 6 h period. The plasmid was purified and used to transfect mammalian cells in order to verify the expression of the transcript mRNA. The cDNA sequence of the transcript was compared with other gene sequences of *Leptospira* available online in databases. Nucleotide identity was greater than 94%. The results suggest that the developed bioprocess in this work may be used to produce a plasmid with a potential use as a vaccine against leptospirosis.

I INTRODUCCIÓN

La leptospirosis, causada por la bacteria del género *Leptospira*, es un problema de salud pública tanto en países subdesarrollados como en países desarrollados. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) cada año se presentan de 300,000-500,000 casos nuevos de leptospirosis en el mundo (Smythe, 1999). Sin embargo, se cree que la prevalencia de la enfermedad está subestimada (Hartskeerl, 2006). El éxito del control de esta enfermedad depende principalmente de la prevención. Existen programas sanitarios que promueven la prevención de la leptospirosis a través del control poblacional de vectores (principalmente roedores), control y monitoreo de áreas húmedas, control de higiene ocupacional e inmunización con vacunas comerciales de animales domésticos y humanos (Terpstra, 2003). Actualmente existen solo vacunas tradicionales, que aun cuando tienen un porcentaje de protección aceptable también presentan algunas desventajas: entre las que destacan una protección de corta duración, reacciones adversas y por lo general son específicas solo para un tipo de serovariedad de leptospira (Hill, 2006; Minke et al., 2009; Wang et al., 2007).

Por otro lado las vacunas de ADN son una estrategia de vacunación novedosa que no produce reacciones adversas, tiene bajo costo de producción, elevada estabilidad térmica y proporciona una respuesta inmunitaria tanto celular como humoral (Hasan et al., 1999). Éstas vacunas están constituidas de plásmidos comerciales genéticamente modificados, los cuales transfieren genes específicos del agente infeccioso, a células del organismo que se quiere proteger. Dichos genes deben poseer principalmente dos características: expresar proteínas con potencial inmunogénico y por lo general ser conservadas (Liu, 2003). Estudios previos han demostrado que la proteína de membrana externa LipL32 de *Leptospira* es una de las proteínas más abundantes de la bacteria y que además tiene potencial inmunogénico (Cullen et al., 2005; Guerreiro et al., 2001; Haake et al., 2000; Vivian et al., 2009). La presente investigación tiene la finalidad de desarrollar un bioproceso para la obtención de ADN plasmídico, conteniendo el gen LipL32, de uso potencial como vacuna contra leptospirosis.

II ANTECEDENTES

2.1 Leptospirosis

La leptospirosis fue descrita por primera vez por Adolf Weil en 1886, como un síndrome icterico con falla renal. Esta enfermedad infecciosa es causada por bacterias patógenas llamadas leptospiras que son transmitidas, directa o indirectamente, desde los animales a los seres humanos (Levett, 2001). Los mecanismos de infección son a través de la piel erosionada, mucosa ocular y nasal, al estar en contacto con agua, suelos húmedos y vegetación contaminada con orina, o por manipular fetos, placentas y vísceras de animales infectados (Barrett and Stanberry, 2009; Levett, 2001). Generalmente el curso de la infección es leve y asintomático, pero puede llegar a ser grave y mortal si afecta órganos vitales como hígado, riñón, pulmón, cerebro y bazo. Se distinguen 2 tipos clínicos de la enfermedad: anictérico (85 a 90% de los casos) considerado el cuadro más benigno, y el icterico o hepatonefrótico (5 a 10% de los casos) que puede llegar a ser fatal si no es debidamente tratado (Céspedes, 2005).

Las manifestaciones clínicas, dependiendo de la serovariedad invasora, con un periodo de incubación de 10 días por lo general son: temperatura elevada, cefalea, escalofríos, diaforesis, disnea de esfuerzo, astenia, adinamia, mialgias, artralgias, derrame y hemorragia conjuntival, uveítis, náuseas, vómito, diarrea, dolor testicular, ictericia, exantemas maculopapulares, petequias o purpúricos principalmente en tronco (Barrett and Stanberry, 2009; Plank and Dean, 2000). En ocasiones más severas además puede presentar otras complicaciones como: pielonefritis, sangrado, insuficiencia renal, glomerulonefritis, neumonía, meningitis, hepatitis o esplenomegalia (Plank and Dean, 2000).

2.2 Agente etiológico

En 1915 el agente etiológico de la leptospirosis fue descubierto en Japón y Alemania, cuando se observó la presencia de espiroquetas y producción de anticuerpos específicos contra la misma bacteria en la sangre de un grupo de mineros japoneses y de un grupo de soldados

alemanes (Levett, 2001). El agente infeccioso de leptospirosis es una bacteria Gram negativa que pertenece al género *Leptospira*. Actualmente existen dos sistemas de clasificación de *Leptospira* uno se basa en las características fenotípicas y el otro en la homología genética (Bharti et al., 2003). La clasificación fenotípica divide en dos especies de leptospirosas: *Leptospira biflexa* (bacteria saprofita) y *Leptospira interrogans* (bacteria patógena). Esta última se divide en más de 200 serovariedades diferentes, definidas por aglutinación de anticuerpos frente al antígeno homólogo (Barrett and Stanberry, 2009). La otra clasificación se basa en la homología genética del 70% o más entre las distintas serovariedades (Tabla 1).

El género *Leptospira* está genéticamente relacionado con otras espiroquetas. El genoma es de aproximadamente 5.000 kb y está compuesto por dos secciones: un cromosoma de 4.400 kb y uno más pequeño de 350 kb (Xue et al., 2009). Tiene forma de espiral, una longitud de 6 a 20 μm y una anchura de aproximadamente 0.1 μm , pero en ocasiones puede presentar un mayor tamaño (Barrett and Stanberry, 2009; Levett, 2001). El movimiento producido por sus dos filamentos axiales (flagelos periplásmicos) colocados uno a cada lado de la bacteria, es de dos formas translacional y no translacional. *Leptospira* contiene una doble membrana parecida a la de otras bacterias espiroquetas, compuesta por una membrana interna (citoplasmática) y una externa (Lipido A) (Bharti et al., 2003).

Sin embargo lo que la distingue de otras espiroquetas como *Borrelia* y *Treponema* es que su membrana externa está compuesta por lipopolisacáridos (LPS). La variación de carbohidratos en la composición de LPS de las diferentes leptospirosas patógenas refleja su amplia diversidad antigénica o serovariedad (Munford, 2008). La bacteria *Leptospira* es totalmente dependiente de oxígeno y tiene una temperatura óptima de crecimiento entre 29 °C y 30 °C a un pH de 7.2-7.6 (Ellinghausen, 1973). Tiene la capacidad de producir las enzimas catalasa y oxidasa. Puede crecer en un medio simple enriquecido con vitaminas (vitaminas B2 y B12), ácidos grasos de cadena larga, sales de amonio y en ocasiones piruvato o 5-fluoracil, cuando se le desea aislar a partir de fuentes contaminadas (Ellinghausen, 1975). El medio de cultivo que generalmente se utiliza para aislar a *Leptospira* es Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) el cual contiene 1% de albúmina bovina y Tween 80 (ácido graso de cadena larga).

Tabla 1. Clasificación de especies de *Leptospira* (Bharti et al., 2003).

Especies	Serovariedad	Cepa de referencia	Serogrupo	
<i>Patógenos</i>				
<i>L. interrogans</i>	<i>australis</i>	Balico	Australis	
	<i>bratislava</i>	Jez Bratislava	Australis	
	<i>bataviae</i>	Van Tienen	Bataviae	
	<i>canicola</i>	Hond Utrecht IV	Canicola	
	<i>hebdomadis</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	
	<i>icterohaemorrhagiae</i>	RGA	Icterohaemorrhagiae	
	<i>copenhageni</i>	M 20	Icterohaemorrhagiae	
	<i>laí</i>	Laí	Icterohaemorrhagiae	
	<i>pomona</i>	Pomona	Pomona	
	<i>pyrogenes</i>	Salnem	Pyrogenes	
	<i>hardjo</i>	Hardjoprajitno	Sejroe	
	<i>L. alexanderi</i>	<i>manhao</i>	L 60	Manhao
	<i>L. fainei</i>	<i>hurstbridge</i>	BUT 6	Hurstbridge
	<i>L. inadai</i>	<i>lyme</i>	10	Lyme
<i>L. kirschneri</i>	<i>bim</i>	1051	Autumnalis	
	<i>cynopteri</i>	3522 C	Cynopteri	
	<i>grippotyphosa</i>	Moskva V	Grippotyphosa	
	<i>mozdok</i>	5621	Pomona	
	<i>panama</i>	CZ 214K	Panama	
	<i>L. meyeri</i>	<i>semaranga</i>	Veldrat Semarang 173	Semarang
<i>L. borgpetersenii</i>	<i>ballum</i>	Mus 127	Ballum	
	<i>castellonis</i>	Castellon 3	Ballum	
	<i>javanica</i>	Veldrat Bataviae 46	Javanica	
	<i>sejroe</i>	M 84	Sejroe	
	<i>tarassovi</i>	Perepilitsin	Tarassovi	
<i>L. weilli</i>	<i>celledoni</i>	Celledoni	Celledoni	
<i>L. noguchii</i>	<i>fortbragg</i>	Fort Bragg	Autumnalis	
<i>L. santarosai</i>	<i>brasiliensis</i>	An 776	Bataviae	
	<i>georgia</i>	LT 117	Mini	
	<i>pingchang</i>	80-412	Ranarum	
<i>Genomospecies 1</i>	<i>pingchang</i>	80-412	Ranarum	
<i>Genomospecies 4</i>	<i>haulin</i>	LT 11-33	Icterohaemorrhagiae	
<i>Genomospecies 5</i>	<i>saopaulo</i>	Sao Paulo	Semarang	
<i>Saprophytas</i>				
<i>Genomospecies 3</i>	<i>holland</i>	Waz Holland (p438)	Holland	
<i>L. biflexia</i>	<i>patoc</i>	Patoc I	Semarang	
<i>L. wolbachii</i>	<i>Codice</i>	CDC		

También existen otros medios de cultivo en los cuales se puede aislar la bacteria: Korthof (peptona, NaCl, NaHCO₃, KCl, CaCl₂, KH₂PO₄ y Na₂HPO₄), Fletcher (peptona, extracto bovino, NaCl, y agar) y Stuart con 10% de suero de conejo (Levett, 2001).

2.3 Epidemiología

La leptospirosis tiene una distribución mundial y afecta zonas urbanas y rurales de países en vías de desarrollo y países desarrollados. La mayor incidencia ocurre en regiones tropicales donde el periodo de lluvia es prolongado y el clima es caluroso; y con más severidad cuando existen inundaciones, huracanes u otros desastres naturales. Sin embargo también en zonas templadas existen casos de leptospirosis y en algunos países inclusive casos endémicos (Lloyd-Smith et al., 2007; Plank and Dean, 2000). La leptospirosis es mantenida por la persistente colonización de la bacteria en el túbulo renal proximal de los animales infectados principalmente de cerdos, vacas, caballos, perros, ratas, murciélagos, ovejas, mapaches y marsupiales. Los cuales secretan por la orina a la bacteria infectando directa o indirectamente al hombre y otros animales (Bharti et al., 2003; Vijayachari et al., 2008).

Esta enfermedad por mucho tiempo se ha asociado al tipo de actividad que las personas realizan como la ganadería, agricultura, acuicultura, deportes acuáticos, medicina veterinaria, minería y otras actividades donde se tiene contacto directo con animales infectados o bien agua y suelos donde pudiera estar contaminado por desechos de animales infectados (Ganoza et al., 2006). La transmisión de esta enfermedad entre humanos es rara debido a que el pH de la orina humana limita la supervivencia de la bacteria. Sin embargo se han reportado casos de transmisión por vía sexual (Levett, 2001).

Algunos estudios epidemiológicos recientes han comparado la incidencia y prevalencia de casos de leptospirosis entre ambos sexos. Se ha visto que el hombre tiene mayor incidencia que la mujer (hasta un 93%), sin embargo no está relacionado a un mayor grado de exposición (Lloyd-Smith et al., 2007). Y otros estudios han reportado una similar distribución de casos entre ambos sexos (Reis et al., 2008). También se ha comparado la incidencia de casos en menores de edad (<15 años) y se ha visto que ese grupo de edad aunque también está en

constante contacto con fuentes contaminadas tienen menor incidencia y grado de mortalidad. Además los signos y síntomas que manifiestan los menores son más leves que en los adultos (Plank and Dean, 2000).

Estudios de seroprevalencia indican que la infección subclínica es común mundialmente. Sin embargo se cree que la prevalencia está subestimada debido a varios factores; a que los anticuerpos específicos contra *Leptospira* no estén presentes en concentraciones detectables cuando se realiza el diagnóstico; a que el punto de corte del método serodiagnóstico (sensibilidad) varíe de un laboratorio a otro; y a que cuando una muestra es llevada a un laboratorio de referencia localizado en otro país, puede ser comparada contra una cepa distinta a la que originalmente estuvo expuesta en su país de origen provocando un resultado erróneo (Cachay and Vinetz, 2005; Plank and Dean, 2000).

2.4 Prevención

Debido al gran número de serovariedades de la bacteria, fuentes de infección y las amplias diferencias en las condiciones de transmisión, el control de la leptospirosis es complicado y depende de las condiciones locales (Reis et al., 2008). El control puede ser alcanzado reduciendo la infección en las poblaciones de animales reservorio tales como perros o ganado (Terpstra, 2003). Las medidas preventivas deben estar basadas en el conocimiento de los grupos particularmente vulnerables a la infección y los factores epidemiológicos locales (Reis et al., 2008). La prevención y control deben dirigirse a: la fuente de infección, la ruta de transmisión entre la fuente de infección y el huésped humano, y a la infección en el huésped humano. Generalmente la fuente de infección de las leptospirosis son animales portadores incidentales o huéspedes naturales (de mantenimiento) (Terpstra, 2003).

Si se identifica una probable fuente o fuentes de infección, ya sea natural o accidental, los animales sospechosos deben ser examinados para determinar si ellos son los portadores de leptospirosis y si están excretando los organismos en su orina. Si se confirma que aquellos animales son portadores de la bacteria, se puede llevar a cabo las siguientes acciones (Terpstra, 2003):

- Los animales infectados (bovinos/cerdos/perros) pueden ser aislados y si es necesario ser destruidos o sacrificados.

- Los animales infectados pueden ser tratados con antibióticos para controlar la excreción de leptospiras.

- Los roedores (ratas, ratones) pueden ser envenenados.

- Los roedores y animales salvajes pueden ser capturados o impedirles el acceso al ambiente humano.

- Las vacunas pueden ser usadas para la inmunización de mascotas y animales de granja.

En las vías de transmisión también se pueden llevar a cabo algunas medidas sanitarias para prevenir el contagio:

- Uso de ropa protectora (botas, guantes, gafas, delantales, máscaras).

- Cubrir las lesiones de la piel con ropa impermeable.

- Lavarse o tomar una ducha después de haber estado expuesto a salpicaduras de orina, suelo o agua contaminada.

- Desarrollar conciencia sobre los riesgos potenciales y los métodos para prevenir o minimizar la exposición.

- En donde sea posible, desinfectar las áreas contaminadas (fregar pisos en establos, carnicerías, mataderos, etc.).

- Proveer de agua potable.

- Mecanizar actividades tales como la cosecha de arroz o el corte de caña.

- Implantar buen manejo del ganado (evitando pastoreos comunales y comprando ganado con certificado de estar libre de leptospiras).

- Introducir y establecer procedimientos de seguridad estandarizados en laboratorios.

Las medidas sanitarias a nivel huésped humano están más enfocadas a prevenir la infección mediante la difusión de la enfermedad a la comunidad, educación y actualización a médicos, profilaxis con antibióticos e inmunización, comprenden las medidas siguientes:

- Difusión de información sobre la enfermedad. Con la finalidad de incrementar la conciencia en la población en general y grupos en riesgo se deben implementar programas de difusión masiva. Con el fin de que las personas entiendan la enfermedad y eviten los riesgos;

pero también que sepan que deben buscar ayuda médica oportuna si se sospecha de leptospirosis después de la exposición.

- Educación y actualización de médicos. Se debe divulgar de forma regular información sobre los síntomas de la leptospirosis, factores de riesgo, pruebas diagnósticas y estrategias terapéuticas a médicos y personal vinculado a los servicios de salud.

- Profilaxis con antibióticos. El tratamiento profiláctico completo está indicado si se conoce que ha ocurrido la exposición. Se reporta que la doxiciclina ofrece algún grado de protección a individuos expuestos en áreas no endémicas. Sin embargo se ha probado que la penicilina, amoxicilina y cloranfenicol son los 3 mejores antibióticos para combatir la infección.

- Inmunización. En países en donde se dispone de vacunas, la inmunización es considerada cuando existe un problema importante de salud pública. Por ejemplo países como China, Japón, Francia y Cuba cuentan con vacunas de tipo inactivadas para humanos. Aunque tienen un buen grado de protección, suelen producir reacciones adversas, su protección es relativamente corta y serovariedad-específica.

Es de interés científico y social producir una vacuna con la capacidad de proteger contra cualquier serovariedad de *Leptospira* y poder ser utilizada en cualquier parte del mundo. Ésta vacuna además, deberá cumplir con ciertas características que mejoren la calidad de las ya existentes.

2.5 Tipos de vacunas

Las vacunas tradicionales por lo general son un preparado de antígenos que una vez dentro del organismo provoca una respuesta inmunológica protectora. Esta respuesta genera memoria inmunológica produciendo, en la mayoría de los casos, inmunidad permanente frente a la enfermedad. Si el organismo se expone al agente infeccioso, contra el cual fue vacunado, el sistema inmunitario responde neutralizándolo antes de que pueda entrar en las células del organismo y al mismo tiempo destruye las células que ya han sido infectadas, antes de que el agente se pueda multiplicar (Liu, 2003; Smooker et al., 2004).

Actualmente las vacunas se clasifican como primera, segunda y tercera generación de acuerdo al desarrollo tecnológico que implica cada una de ellas. Las vacunas tradicionales o de primera generación son de cuatro tipos: inactivadas, vivas atenuadas, toxoides y subunitarias. Las inactivadas están compuestas por microorganismos patógenos que han sido tratados con productos químicos o calor y han perdido su capacidad de infectar, por ejemplo la vacuna de la gripe, cólera, peste bubónica y la hepatitis A. La mayoría de este tipo de vacunas suelen ser incompletas o de protección limitada, por lo que es necesaria una revacunación (Almond, 2009; Palatnik-de-Sousa, 2008).

Las vacunas vivas atenuadas están constituidas por microorganismos que han sido cultivados expresamente bajo condiciones en las cuales pierden sus propiedades nocivas; suelen provocar una respuesta inmunológica más duradera y son las más utilizadas en los adultos, por ejemplo la vacuna contra la fiebre amarilla, sarampión, rubéola y paperas (Almond, 2009; Palatnik-de-Sousa, 2008).

Las vacunas de toxoides se basan en el uso de toxinas inactivadas, que son los patógenos y no el organismo productor que provocan la enfermedad; como las vacunas contra el tétanos y la difteria. Las vacunas subunitarias más que introducir un microorganismo atenuado o inactivo entero dentro de un sistema inmunológico, utiliza un fragmento de éste para provocar la respuesta. Un ejemplo característico es la vacuna subunitaria contra la hepatitis B, que esta compuesta por la capsula del virus. A pesar de que éstas vacunas han sido la salvación de muchas personas desde el siglo XVIII, la aplicación de éstas en ocasiones causa reacciones adversas, requieren de más de una aplicación, la manipulación suele ser peligrosa o bien pudieran recuperar la capacidad infecciosa y además suelen ser muy sensibles a la temperatura (Hasan et al., 1999).

Es por eso que desde hace unos años se han desarrollado otros tipos de vacunas como lo son las de segunda y tercera generación, que a diferencia de las tradicionales son más seguras y relativamente más fáciles de obtener. Algunas vacunas de segunda generación utilizan subunidades (de baja inmunogenicidad) del agente infeccioso unidas a proteínas conocidas que si provocan una respuesta inmune. Otras utilizan proteínas recombinantes del

agente infeccioso, u otro microorganismo (virus o bacterias atenuadas) comò vector (Almond, 2009; Palatnik-de-Sousa, 2008).

Las vacunas de tercera generaci3n son las m1s novedosas debido a la tecnolog1a que se emplea para producirlas. Estas 1ltimas llamadas vacunas de ADN plasm1dico (ADNp), est1n constituidas de una parte del genoma del agente infeccioso de inter1s que codifica para la s1ntesis de prote1nas que realizan una acci3n terap1utica o inmunizante en el organismo que se desea proteger. La vacunaci3n con ADNp imita la expresi3n gen1tica intracelular provocada por el pat3geno en condiciones naturales, induciendo una respuesta inmunol3gica tanto humoral como celular en el organismo; por lo que puede lograr la misma protecci3n que otorgan las vacunas basadas en cepas virulentas vivas o atenuadas (Figura 1) (Liu, 2003; Smooker et al., 2004).

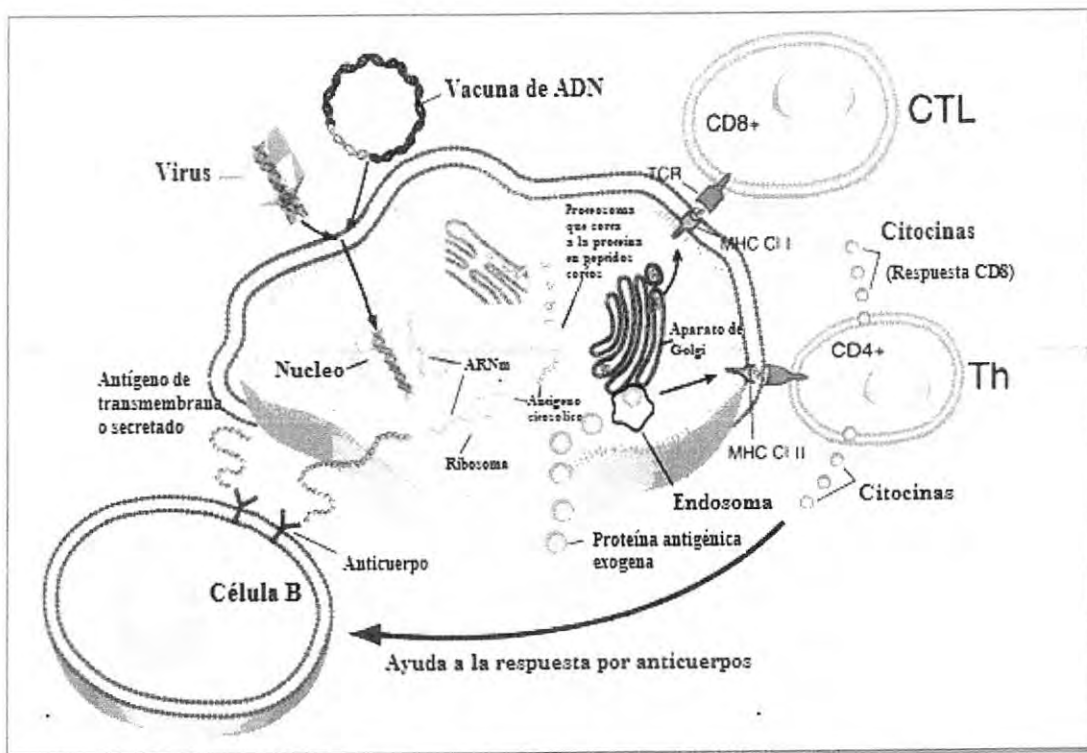


Figura 1. Semejanza del mecanismo de acci3n entre las vacunas de ADNp y virus vivos (Liu, 2003).

En general las vacunas de ADNp son consideradas muy seguras debido en parte a la falta de integración genética en las células humanas y a la ausencia de respuesta inmune hacia ellas. Otras importantes ventajas de estas vacunas es que son producidas en vectores no virales, sus tiempos de producción son relativamente cortos y los métodos para su producción tienen un desarrollo tecnológico avanzado. Una característica muy importante de estas vacunas es su gran estabilidad térmica. Almacenadas pueden transportarse a temperatura ambiente; de tal manera que en países con comunidades rurales muy alejadas, donde la eficacia de algunas vacunas tradicionales se pierde debido a un manejo inapropiado y a la poca estabilidad de la vacuna, las vacunas de ADNp presentan una alternativa viable para su distribución (Prather et al., 2003).

Recientemente estas vacunas se han probado para prevenir o tratar distintas enfermedades. Se ha observado que con la administración de estas vacunas, en pacientes con VIH, presentan una adecuada respuesta inmunológica celular y/o humoral. En pacientes con malaria, se ha observado que las vacunas de ADNp producen una efectiva respuesta inmunológica de tipo citotóxica. También se ha probado la eficacia de estas vacunas en pacientes con hepatitis B, los cuales produjeron una buena respuesta inmune tanto de tipo humoral como celular (Garza-Velasco et al., 2007).

Otro estudio hecho en modelo murino, donde se compararon tres tipos de vacunas diferentes contra leishmaniasis (de proteína purificada, de proteína recombinante y de ADNp) mostró que la vacuna de ADNp fue la más eficaz reduciendo en un 88% la carga parasitaria y en un 65% el tamaño de lesión. En general se ha demostrado que las vacunas de ADNp presentan mayor seguridad y una buena respuesta inmunológica (Aguilar y col., 2005).

2.6 Producción de vacunas de ADNp

Para producir una vacuna de ADNp deben de ser considerados varios aspectos como: i) selección del gen de interés, ii) selección del vector de expresión, iii) selección y reproducción de la célula hospedadora y iv) recuperación del plásmido (Garza-Velasco et al., 2007).

2.6.1 Selección del gen de interés

El gen que se selecciona debe tener la cualidad de codificar para una proteína inductora de la respuesta inmunológica en el organismo que se va a vacunar. Además éste gen deberá ser conservado, con la finalidad de que en el agente infeccioso no vaya a sufrir algún cambio en su secuencia y que a la postre cuando se vacune con el plásmido no induzca una respuesta inmunológica frente a la nueva proteína modificada.

2.6.2 Selección del vector de expresión

Las vacunas de ADNp están compuestas de plásmidos (vector) de origen bacteriano, modificados biotecnológicamente, a los cuales se les inserta un gen proveniente del agente infeccioso de interés (Montgomery and Prather, 2006).

Para la producción de vacunas de ADNp, es de suma importancia que el vector presente una serie de características para su óptima reproducción en la célula hospedera y su adecuada expresión en la célula blanco. En relación a su reproducción en la célula hospedero, el vector debe contar con un adecuado origen de replicación y marcadores selectivos. Para su adecuada expresión en la célula blanco, el vector requiere un promotor de replicación eficiente, un sitio de inserción del gen de interés y una terminación poliadenil (Tejeda-Mansir and Montesinos, 2008) (Figura 2).

Los vectores deben presentar un origen de replicación bacteriano que permita un alto grado de replicación en la célula hospedera, para obtener un rendimiento elevado en la producción de plásmido. Los vectores deben presentar un origen de replicación bacteriano que permita un alto grado de replicación en la célula hospedera, para obtener un rendimiento elevado en la producción de plásmido. Los orígenes de replicación más utilizados son los de tipo ColE1, pMB1 o pUC. Para la selección de las células recombinantes, el vector debe contener un marcador selectivo que suele ser un gen de resistencia a un antibiótico (por lo regular a kanamicina ó ampicilina) (Hasan et al., 1999; Prather et al., 2003).

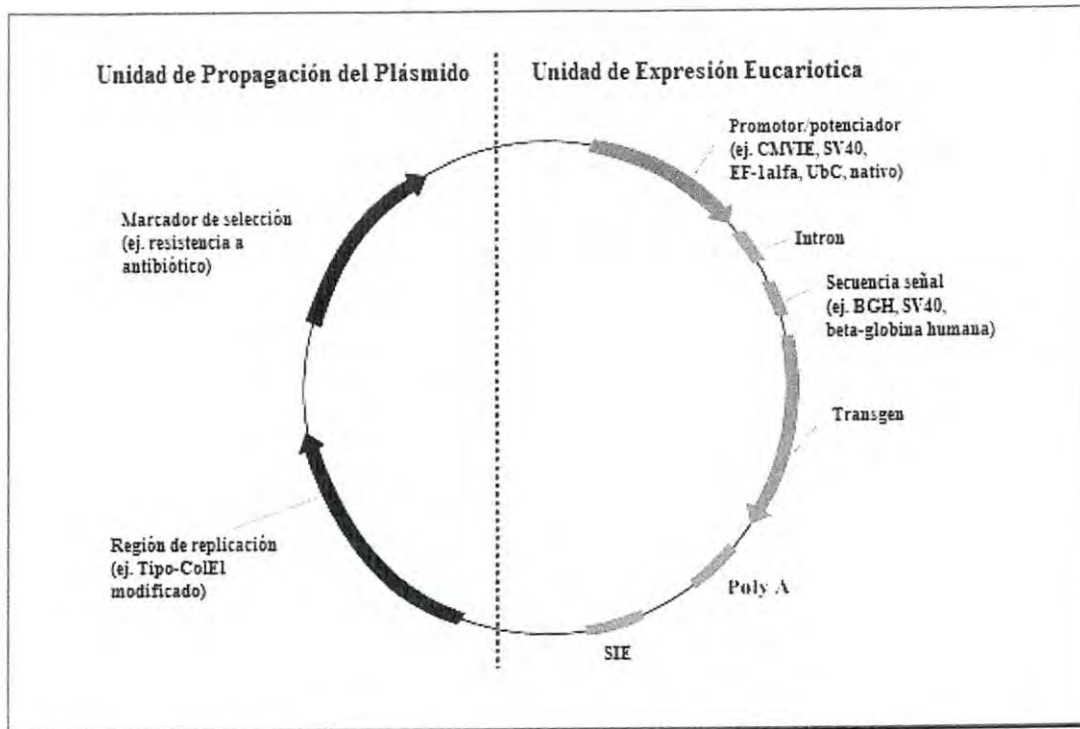


Figura 2. Mapa característico de un vector de expresión utilizado como vacuna de ADNp (Adaptada de (Tejeda-Mansir and Montesinos, 2008).

Para su expresión en la célula blanco debe tener un promotor eficaz, para maximizar la expresión transitoria del gen una vez dentro de la célula blanco. Uno de los promotores más utilizados es el del citomegalovirus. Para la terminación de la transcripción del gen de interés el vector debe contar con una señal, siendo una de las más utilizadas una región de la poliadenilación de la BGH (hormona de crecimiento bovino, por sus siglas en ingles) (Garmory et al., 2003; Montgomery and Prather, 2006; Tejeda-Mansir and Montesinos, 2008).

2.6.3 Selección y reproducción de la célula hospedara

El plásmido modificado requiere de una bacteria (hospedero), que sea fácil de manejar, bien conocida y de preferencia genéticamente modificada, para ser reproducido o clonado n

veces (Garmory et al., 2003). Por lo general se utiliza la bacteria *Escherichia coli* atenuada, la cual cumple con dichas características, no es patógena y tiene limitada la supervivencia si se libera en el medio ambiente. Las cepas de *Escherichia coli* DH5 y azul XL1 son las más utilizadas para producción de plásmidos. Ambas cepas cuentan con mutaciones genéticas como *endA1*, *relA* y *recA* que les confieren características especiales. La *endA1* previene la degradación del plásmido después de la lisis celular, el *relA* le permite soportar condiciones limitantes de sustrato y el *recA* garantiza la estabilidad (Carnes, 2005).

La producción de plásmido a gran escala con *E. coli*, requiere de una optimización del número de plásmidos (rendimiento) y de la concentración celular. La fermentación es un método para la producción de *E. coli* recombinante que ha sido extensamente estudiado. Primeramente se cultivan las células a una escala pequeña regularmente en matraces para optimizar las condiciones de cultivo (Figura 3). Después cuando se han especificado todas las condiciones, se llevan las células a un fermentador de mayor tamaño (2-20 L) para producir una extensa concentración celular.

Existen dos tipos de fermentación que se utilizan para producir grandes cantidades de masa celular, fermentación por lote y cultivo continuo. Este último cuando es controlado correctamente, se puede tener todas las concentraciones de sustancias en el biorreactor constantes durante el tiempo de cultivo. En el caso del cultivo por lote, solamente el aire y el título del pH son controlados, el resto de los otros factores se dejan a expensas durante todo el cultivo. Otra variante del sistema por lote es el de lote alimentado, que además del aire y el pH, también controla la fuente de carbono (Ratledge and Kristiansen, 2006).

Los métodos para producción de ADN por lote, generalmente tienen un rendimiento relativamente bajo de biomasa (1-8 g/L) y por ende un rendimiento de plásmido también bajo (60 mg/L).

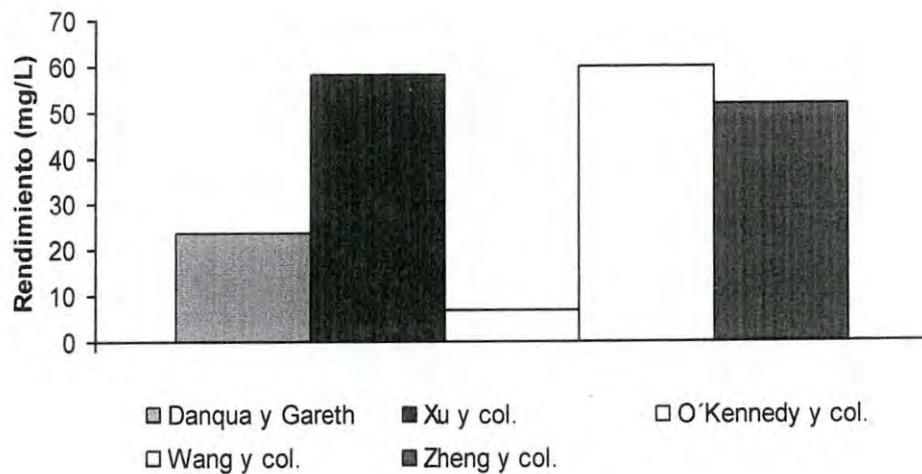


Figura 3. Rendimiento plasmídico de cultivos de *E. coli*, en matraz.

En cambio los métodos por lote alimentado tienen un mejor desempeño. Se ha visto que se pueden alcanzar de 55-60 g/L de biomasa y un rendimiento de 220 mg/L de plásmidos, y en ocasiones optimizando las condiciones se ha podido lograr tener rendimientos plasmídicos de 1.1 g/L (Figura 4).

a) Factor químico que afecta la reproducción de la célula hospedero: medio de cultivo

Los plásmidos de ADNp son producidos a partir de procesos de fermentación que tienen en interacción al hospedero del plásmido y al medio de cultivo. La formulación de estos medios de cultivo puede influenciar dramáticamente el crecimiento bacteriano. A través del tipo y concentración de los ingredientes usados en el medio de cultivo se puede influir en las cantidades de biomasa obtenida y en los rendimientos de producción de plásmidos. Algunos medios de cultivo tienen una variedad de nucleótidos que le brindan a la bacteria la energía necesaria para mantenerse en constante replicación y minimizar cualquier otra actividad (Carnes, 2005; Prather et al., 2003). El balance de nutrientes se basa en los requerimientos celulares y en su composición elemental (Tabla 2).

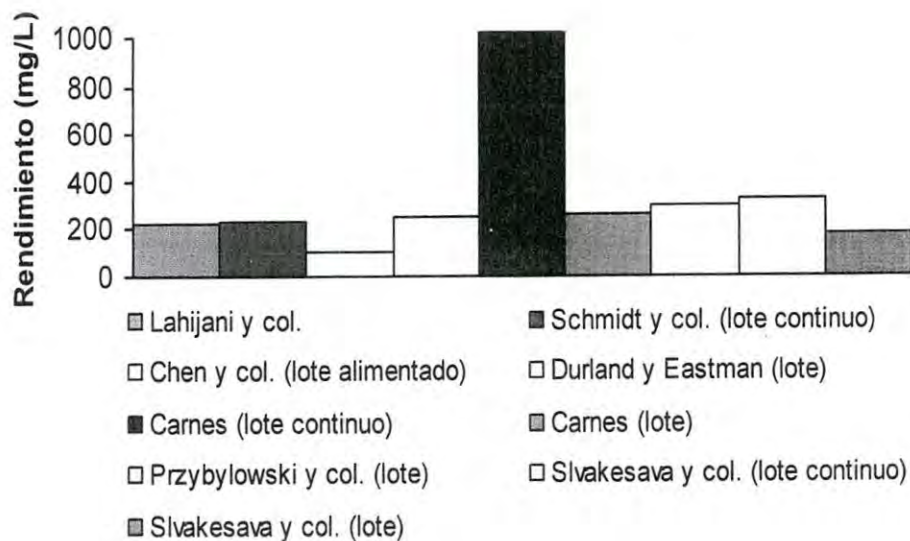


Figura 4. Rendimiento plasmídico de algunos procesos de fermentación por lote y lote alimentado.

Comúnmente los medios de cultivo simples solo contienen fuentes de carbono, de nitrógeno, varias sales y trazas de metales. Los medios de cultivo semidefinidos contienen compuestos complejos que suplen a los factores de crecimiento (aminoácidos, purinas y pirimidinas) por ejemplo extractos de levadura, casaminoácidos y peptonas, los cuales permiten altas densidades celulares. La fuente de carbono, por lo general el nutriente limitante, provee energía y biomasa. La glucosa es la fuente de carbono más usada ya que es barata y muy fácil de metabolizar, sin embargo tiene el inconveniente de producir altos niveles de acetatos, los cuales inhiben el crecimiento celular. Para evitar la formación de acetatos, se le puede adicionar glicerol al medio de cultivo con glucosa o bien sustituir la fuente de carbono por glicerol. La fuente de nitrógeno proviene de amonio o sales de amonio en cultivos simples.

Tabla 2. Composición elemental de la bacteria *E. coli*, peso seco (Carnes, 2005).

<i>Elemento</i>	<i>Porcentaje en peso</i>
Carbono	50-53
Hidrogeno	7
Nitrógeno	12-15
Fósforo	2-3
Sulfuro	0.2-1.0
Potasio	1.0-4.5
Sodio	0.5-1.0
Calcio	0.01-1.10
Magnesio	0.1-0.5
Cloro	0.5
Hierro	0.02-0.20

En cultivos semidefinidos el nitrógeno es suplido con extractos de levadura, casaminoácidos y/o peptonas (Carnes, 2005; Danquah and Forde, 2007).

También son necesarios minerales para el óptimo crecimiento bacteriano, metabolismo y reacciones enzimáticas. Es por ello que en la mayoría de los medios de cultivo se les adiciona pequeñas cantidades de magnesio, fósforo, potasio y azufre, en forma de sales principalmente. Las sales de fosfatos y/o de potasio proveen al medio de cultivo función de buffer en cierta medida. Se ha visto que las sales de sulfato de magnesio (azufre y magnesio) en altas concentraciones (~80 mM) beneficia la producción de plásmidos súper-enrollados.

Otros tipos de minerales como hierro, manganeso, cobre, calcio, cobalto, molibdeno y zinc son requeridos en pequeñas cantidades, aun que en ocasiones ya vienen en algunos

ingredientes como impurezas. Cuando se requiere, la osmolaridad es ajustada con cloruro de sodio (Carnes, 2005).

La mayoría de los trabajos en microbiología, se ha visto que la glucosa es la fuente de carbono mas utilizada en los medios de cultivo para crecer *E. coli*. Se encontró que la mejor fuente de carbono en el medio de cultivo MBL fue la glucosa con un rendimiento plasmídico de 58.3 mg/L, cuando se adiciono 5 g/L al medio de cultivo.

También observaron que si al medio se le adicionaba glicerol (4 g/L) o acetato (<3 g/L) aumentaban los rendimientos y la especificidad. Además compararon distintas fuentes de nitrógeno, siendo la de extracto de levadura la que dio mejores rendimientos (60.8 mg/L) (Xu et al., 2005). Sin embargo, en otro estudio se observó que la sacarosa como fuente de carbono en el medio Luria Bertani tiene mejores rendimientos para la producción de plásmidos, en comparación con el medio que contenía glucosa (28.27 mg/L y 7.73 mg/L respectivamente).

En dicho estudio también se evaluaron varias fuentes de nitrógeno y se encontró que la peptona caseína fue la que tuvo mejor rendimiento en la producción de plásmidos. De igual forma se busco la mejor proporción carbono-nitrógeno (C:N), y encontraron que la proporción C:N 3.82:1 es la ideal (Zheng et al., 2007).

Por otro lado Danquah y Forde en el 2007, compararon el rendimiento en la producción de plásmidos con distintos medios de cultivo. Observaron que un medio de cultivo modificado, según un modelo estequiométrico, llamado PDMR (plasmid DNA medium) el cual contenía 4% de glucosa como fuente de carbono, tuvo mejores rendimientos (23.8 mg/L) comparado con el medio LB (6.1 mg/L). En este estudio se encontró que la mejor proporción C:N es de 2.8:1. De igual forma (O'Kennedy et al., 2000), observaron que la proporción C:N que más rendimientos refleja en la producción de plásmidos es de C:N 2.78:1. En estos trabajos se deja en claro que el tipo y proporción de nutrientes, en especial la fuente de carbono y nitrógeno, son esenciales para la producción de plásmidos.

- b) Factores físicos que afectan la reproducción de la célula hospedero: temperatura, pH y concentración DO.

Así como los factores químicos en la producción de plásmidos, los factores físicos también juegan un papel importante. Se ha visto que la concentración de oxígeno y la temperatura afectan en lo enrollado del plásmido. En cuanto a la estabilidad del plásmido, se ha encontrado que la concentración de oxígeno afecta directamente. También se ha visto que la fermentación de *E. coli* bajo condiciones limitantes de oxígeno o ausencia del mismo, puede provocar productos de inhibición por acetatos (Prazeres et al., 2001). En un estudio hecho por (Hopkins et al., 1987), observaron que una simple gota en una concentración de 5% de oxígeno disuelto (DO) provocó una rápida pérdida en la estabilidad del plásmido. (Namdev et al., 1993), encontraron que la fluctuación de la concentración de oxígeno influyó en la estabilidad del plásmido. (Bhattacharya and Dubey, 1997), probaron el efecto del oxígeno a distintas concentraciones y vieron como afectaba éste en la productividad y expresión proteica de *E. coli*. Llegaron a la conclusión que a mayor concentración de oxígeno se tienen mejores rendimientos celulares y que la concentración óptima de oxígeno es de 0.16 mmoles/L.

Se conoce que la temperatura óptima de crecimiento para *E. coli* es de 37° C. Por tal motivo, la temperatura es una importante variable que puede ser usada para controlar el metabolismo celular. Se ha visto que bajando la temperatura de 37° C a 26-30° C se pueden reducir la captura de nutrientes y la tasa de crecimiento celular, esto se manifiesta en la reducción de productos tóxicos y los generados por calor metabólico. Así mismo, la reducción de la temperatura disminuye la demanda de oxígeno, lo cual permite un aumento en la densidad celular (Prazeres et al., 2001).

El pH es otro factor importante que se debe tomar en cuenta para cultivar *E. coli*. Se sabe que el pH condiciona la formación y actividad de muchas enzimas. En un estudio se demostró el efecto del pH en el crecimiento de *E. coli*, donde se probó en la actividad enzimática, se observó que la actividad efectiva de muchas enzimas se logra a pH entre 6 y 8 (Gale and Epps, 1942).

2.6.4 Recuperación del plásmido

Una vez propagado el plásmido en el hospedero (*E. coli*), lo siguiente es liberarlo y purificarlo de impurezas para su posterior manejo. Los pasos que en general se deben seguir para recuperar el plásmido son: cosecha celular del medio de cultivo, lisis de la membrana celular, clarificación y concentración, y purificación del ADN plasmídico (Ferreira et al., 2000).

a) Cosecha celular

Al término del cultivo celular se requiere de una suspensión concentrada de células producida ya sea a través de microfiltración o centrifugación continua. Además de proporcionar la mezcla de células concentrada, en este paso se elimina la mayoría del caldo de cultivo, el cual pudiera interferir en los siguientes pasos de la purificación. Se debe considerar que estas dos formas de cosecha requieren de un atento cuidado debido a una posible contaminación de la membrana y a una limpieza continua de la centrifuga, respectivamente (Prather et al., 2003).

b) Lisis celular

Una vez terminada la cosecha celular, se necesita de la extracción del ADN plasmídico mediante un proceso mecánico o químico. En este paso son liberados todos los componentes intracelulares: ADN genómico, ARN, proteínas, endotoxinas y ADN plasmídico. En este paso es crucial obtener la mayor cantidad posible de plásmido superenrollado y procurar que permanezca lo más intacto posible (Ferreira et al., 2000; Prather et al., 2003).

Se han probado procesos mecánicos tales como sonicación, homogenización, congelación y descongelación, microfluidización y molienda con perlas. Siendo estos dos últimos procesos los que menos daños provocan al plásmido. Por otro lado la lisis alcalina es el proceso químico mas usado para lisar las células del hospedero. Además de lisar la membrana de la célula, también desnaturaliza el ADN genómico y proteínas que se encuentran junto con los dendritos y otras impurezas. Por lo general se emplea un alcali (NaOH 0.2 M) y

un detergente (dodecil sulfato de sodio al 1%), además de tratarse con ARNasa para eliminar todo el ARN del hospedero (Ferreira et al., 2000; Prazeres et al., 2001). Sin embargo, el uso de esta enzima se encuentra restringido cuando la finalidad es hacer pruebas clínicas de la vacuna.

c) Clarificación y concentración

Después del lisado celular deben ser removidas el resto de impurezas (dendritos celulares, ARN, proteínas y ADN genómico desnaturalizadas) para concentrar el ADN plasmídico. Por lo general, para remover ARN y algunas proteínas se usan sustancias caotrópicas (CTAB, cloruro de litio, cloruro de calcio, acetato de sodio y acetato de potasio). En el caso de la concentración del plásmido la sustancia más usada es el polietilenglicol (PEG, por sus siglas en ingles) que además de eliminar ácidos nucleicos pequeños, reduce el volumen del medio y permite un intercambio de soluciones amortiguadoras antes de la siguiente purificación (Ferreira et al., 2000; Prazeres et al., 2001).

d) Purificación del plásmido

Los métodos utilizados para purificar plásmidos son la ultrafiltración o filtración y la cromatografía. Se dice que la filtración es el paso intermedio entre la clarificación y la purificación, y se basa en el uso de membranas polietersulfonas a las cuales se les hace pasar flujo tangencial para separar sustancias. En el caso de la cromatografía su principio general es el de retener y separar selectivamente componentes de una mezcla permitiendo identificar y determinar cantidades de dichos compuestos. Existen varios tipos de cromatografías y se utilizan según convenga dependiendo del tipo de sustancia que se quiera separar (Prazeres et al., 2001).

Una de ellas es la interacción hidrofóbica o intercambio iónico, la cual se basa en separar sustancias de acuerdo a su polaridad, y tiene la ventaja de usarse directamente después del lisado celular; sin embargo tiene la desventaja de usar sustancias muy volátiles, tóxicas y teratogénicas (Prazeres et al., 2001).

Otro tipo de cromatografía es por exclusión por tamaños, que se basa en separar sustancias de menor tamaño de otras de mayor tamaño; el uso de este método representa un 70% de recuperación plasmídica y se usa para separar sustancias pequeñas como ARN, toxinas, iniciadores y sales (Ferreira, 2005).

Por ultimo se puede mencionar a la cromatografía por afinidad, la cual se basa en la separación de las sustancias de acuerdo a su forma. Sin embargo, es poco utilizada para purificar ADN plasmídico, debido a que separa solamente la mitad de la concentración de niveles de endotoxinas, retiene plásmido desnaturalizado y tiene poca capacidad de retención (Ferreira, 2005; Ferreira et al., 2000).

III HIPÓTESIS

Es posible desarrollar un bioproceso para la producción de un plásmido conteniendo el gen LipL32, proveniente de *Leptospira*, de uso potencial como vacuna de ADN contra leptospirosis.

IV OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Desarrollar un bioproceso para la construcción de un vector de ADN plasmídico con el gen LipL32 de *Leptospira* y producirlo a escala matraz.

4.2 Objetivos particulares

- Estandarizar una técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección del gen LipL32 de *Leptospira*.
- Clonar el gen LipL32 en el vector de expresión pVAX1 e integrarlo en un sistema biológico productor de plásmidos (*Escherichia coli*).
- Establecer condiciones para la producción de ADN plasmídico a escala matraz.
- Verificar la expresión de mRNA de LipL32 en células de mamífero *in vitro*.

V MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología seguida se resume a continuación (Figura 5), sin embargo cada tratamiento se explica a detalle en los apartados posteriores.

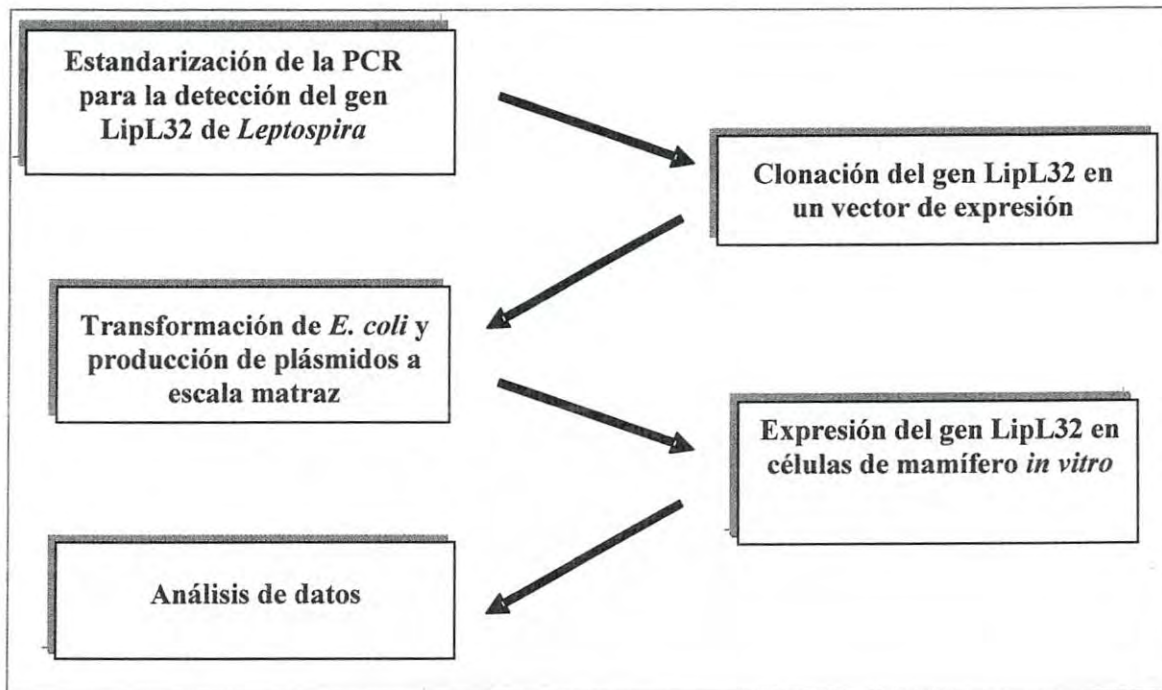


Figura 5. Diagrama metodológico.

5.1 Estandarización de la PCR para la detección del gen LipL32 de *Leptospira*

Todas las muestras clínicas y cepas de referencia fueron proporcionadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Sonora.

5.1.2 Preparación de las cepas de referencia de *Leptospira*

Se inocularon cepas de referencia de *Leptospira* de distintas serovariedades en tubos estériles con 5 ml de medio EMJH (SIGMA) y se dejaron incubando a 29° C durante 7 días ó hasta alcanzar una concentración de 1×10^8 leptospiras/mL. Las serovariedades utilizadas para la estandarización de la PCR fueron: *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *pyrogenes*, *autumnalis*, *cynopteri* y *hardjo*. Dichas serovariedades son las de mayor incidencia en el Estado de Sonora.

5.1.3 Muestras clínicas

Los criterios de inclusión que se tomaron en cuenta para recolectar muestras clínicas fueron: pacientes con sospecha de padecer leptospirosis, que la toma de muestra fuera antes de los primeros 7 días de iniciados los síntomas, pacientes con diagnóstico positivo a leptospirosis mediante la Técnica de Micro Aglutinación (MAT) y que la muestra fuera suficiente para realizar la prueba. Todos los sueros de paciente fueron analizados previamente mediante MAT para comparar los resultados con la PCR.

5.1.4 Extracción y purificación de ADN genómico

La obtención del ADN genómico a partir de las cepas de referencia (del caldo de cultivo) y de los sueros de paciente se realizó con el kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN). Se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril, 200 μ L de cultivo (conteniendo 1×10^8 células/mL ó una $DO_{600}=2$) o bien 200 μ L de suero de paciente y se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min y se descartó el sobrenadante. El botón celular se resuspendió con 180 μ L de buffer ATL. Después se adicionaron 20 μ L de proteinasa K, se agitó y se incubó a 56° C por 1 h, con agitación constante. Posteriormente se agregaron 4 μ L de RNAsa, se dio vortex por 15 s y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 2 min. Después se centrifugó brevemente y se adicionaron 200 μ L del buffer AL, se agitó y se dejó incubando a 70° C por 10 min. Al finalizar la incubación se agregaron 200 μ L de etanol al 100% se dio vortex por 15 s y se centrifugó brevemente. Posteriormente la mezcla del paso anterior se pasó a una columna (tubo colector de 2 mL) y se centrifugó a 8,000 rpm por 1 min.

Se descartó el filtrado del paso anterior y la columna se pasó a otro tubo colector de 2 mL y se adicionaron 500 µL del buffer AW1 se mezcló y centrifugó a 8,000 rpm por 1 min. Después se descartó el filtrado del paso anterior y se paso la columna a un tubo colector de 2 mL donde se adicionó 500 µL del buffer AW2 se mezcló y centrifugó a 14,000 rpm por 3 min. Se descartó el filtrado y se repitió la centrifugación a 14,000 rpm por 1 min, para eliminar el resto de buffer. Para eluir el ADN, se descartó el filtrado del paso anterior y la columna se paso a un tubo estéril de 1.5 mL y se adicionaron 75 µL de agua destilada (grado PCR), se incubó a temperatura ambiente de 5 min y se centrifugó a 8,000 rpm por 1 min.

5.1.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del gen LipL32 de *Leptospira*

a) Detección en cepas de referencia

Para la amplificación de la secuencia codificante completa (819 pb) del gen LipL32 en las cepas de referencia, en un tubo eppendorf de 0.2 mL se colocaron 45 µL de la mezcla de reactivos del kit Platinum PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen), 5 µL (1 a 500 ng) del ADN purificado y 2.5 µL cada iniciador (20 µM) (LipL32 5-GCTCTAGAATGAAAAAACTTTTCGATTTTGGC-3 y LipL32 5-CGGGGTACCTTACTTAGTCGCGTCAGAA-3) (Branger et al., 2005) a un volumen final de 55 µL. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador Gene Cycler™ (BIORAD) con el siguiente programa: un ciclo a 94° C por 5 min, 40 ciclos a 94° C por 15 s, 56° C por 30 s, 72° C por 40 s y una extensión final a 72° C por 10 min. Los productos de la amplificación del gen LipL32 se visualizaron en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio. Posteriormente se realizó una purificación de la banda a partir del gel de electroforesis con el kit QIA-QUICK (QIAGEN) bajo las condiciones del fabricante.

b) Detección en muestras clínicas

Se empleó un juego de iniciadores para la amplificación de un fragmento interno del gen LipL32, de 260 pb, (Hap1FDx 5-GCAAGCATTACCGCTTGTGG-3 y Hap1RDx 5-

TGTTGGGGAAATCATACGAAC-3) (Branger et al., 2005) utilizando el kit Platinum PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen). Se usó un termociclador Gene Cycloer™ (BIORAD) con las siguientes condiciones de corrida: un ciclo a 94° C por 5 min, seguido de 40 ciclos a 94° C por 15 s, 60° C por 35 s, 72° C por 40 s y una extensión final a 72° C por 10 min. Los fragmentos fueron analizados en gel de agarosa al 2%, y teñidos con bromuro de etidio.

5.2 Clonación del gen LipL32 en un vector de expresión

La clonación del gen se realizó utilizando un sistema de enzimas de restricción con ligasa del T4.

5.2.1 Digestión enzimática del gen LipL32 y el vector pVAX1

En un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril se adicionaron 5 µL del producto de PCR ó pVAX1 (Figura 6) µL de buffer de digestión, 0.5 µL de cada enzima de restricción Kpn I y Xba I (BIOLABS), 1.5 µL de BSA, se mezcló y se llevó a un volumen final de 30 µL con agua bidestilada estéril y se incubó a 37° C durante 2 h. Para detener la acción enzimática se calentó la mezcla a 67° C durante 15 min. Después se procedió a purificar las dos reacciones enzimáticas mediante columna (QIAGEN). Seguido de la purificación del pVAX1 se procedió a desfosforilarlo con 3 µL de buffer y 1 µL de CIP (Calf Intestinal Phosphatase) seguido de una incubación a 50° C por 1 h., y por último se purificó mediante columna (QIAGEN).

5.2.2 Ligado del gen LipL32 en pVAX1

En un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril se colocaron 30 pmol del vector pVAX1, digerido y desfosforilado, con 90 pmol del producto de PCR también digerido, 1 µL de buffer 10x de ligasa T4, 0.5 µL de ligasa T4 (BIOLABS) y se llevó a un volumen final de 10 µL con agua destilada estéril, se agitó y se dejó incubando a 16° C durante 16 h.

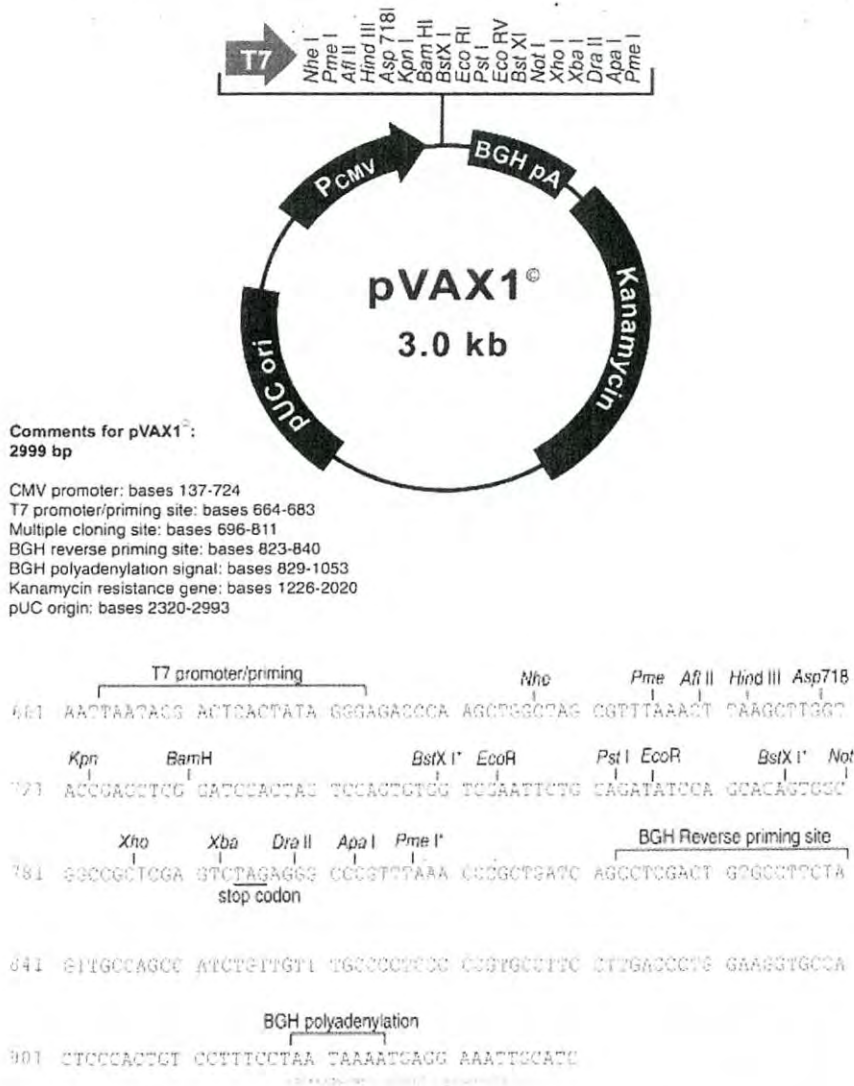


Figura 6. Mapa del vector plasmídico pVAX1.

5.3 Transformación de *E. coli* y producción de plásmidos a escala matraz

Para la propagación del plásmido se transformaron células de *E. coli*, las cuales fueron crecidas en matraces.

5.3.1 Transformación de células *E. coli*

Antes de empezar el procedimiento se inactivó la ligasa T4 de la mezcla anterior mediante la incubación a 65° C durante 10 min. En un tubo de 1.5 mL se agregó 5 µL del producto de clonación y 50 µL de células *E. coli* químicamente competentes (Library Efficiency® DH5α) se mezcló suavemente y se incubó en hielo por 30 min. Posteriormente se paso a un baño María a 42° C por 42 s sin agitar e inmediatamente después se paso a hielo por 3 min. Se agregaron 450 µL de medio Luria Broth (LB) y se incubó a 37° C durante 1 h. Para crecer las células transformadas, se inocularon 100 µL, de la suspensión celular en una caja de petri con medio LB (1.5% de agar, 50 µg/mL de kanamicina, 100 µL de IPTG 100 Mm y 20 µL de X-GAL 50 mg/mL) y se incubó a 37° C durante 18 h.

5.3.2 Selección de colonias transformadas

a) Concentración celular

Se seleccionaron 5 colonias blancas resistentes a kanamicina y se crecieron en tubos de 15 mL con 3 mL de medio LB líquido con kanamicina (50 µg/mL) a 37° C durante 18 h.

b) Extracción de ADN con bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB)

Se centrifugó el tubo del paso anterior a 13,000 rpm por 2 min y el sobrenadante se decantó y se dejó secar. El botón celular formado se resuspendió con 250 µL de STET, 4 µL de Lisozima (50 mg/mL) y 4 µL de ARNasa (10 mg/mL); se calentó a 37° C por 5 min y 45 s en agua hirviendo. Se procedió a centrifugar por 10 min a 13,000 rpm y el botón que se forma se eliminó con un palillo estéril. Se adicionaron 8 µL de CTAB (5% p/v) y se centrifugó por 5 min. El sobrenadante se decantó y el botón se resuspendió con 300 µL de NaCl (1.2 M) y 750 µL de etanol absoluto, se centrifugó 10 min a 13,000 rpm y se decantó. El botón se resuspendió con 500 µL de etanol al 70%, se centrifugo a 13,000 rpm y se decantó. El botón se dejó secar por completo y se resuspendió con 30 µL de agua destilada (grado PCR).

c) Análisis de restricción del vector con enzimas Kpn I y Xba I

Para confirmar la presencia del inserto en el plásmido, en un tubo de 1.5 mL estéril se adicionaron 2 μ L de plásmido purificado, 4 μ L de buffer de digestión, 2 μ L de BSA, 0.8 μ L de Kpn I, 0.8 μ L de Xba I y 24.4 μ L de agua (grado PCR); y se dejó incubando a 37° C por 2 h. Al final se realizó un gel de agarosa al 2%, y se tiñó con bromuro de etidio.

5.3.3 Producción del pVAX1-LipL32 a nivel matraz

A partir de células *E. coli* transformadas con el plásmido pVAX1-LipL32 se preparó el inóculo para la curva de crecimiento. Se tomó parte de una colonia de la placa de crecimiento con el plásmido, y se inoculó en un tubo de ensayo que contenía 2 mL de medio LB y kanamicina (50 μ g/mL), y se incubó a 37° C durante 18 h. Posteriormente dicho inóculo se adicionó a un matraz de 500 mL que contenía 100 mL de medio de cultivo Terrific Broth modificado (TBmod) y kanamicina (50 μ g/mL) y se incubó a 37° C, con agitación constante a 250 rpm hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. Durante este tiempo se midió la absorbancia (ó densidad óptica) a 600 nm, aproximadamente cada hora. Para analizar la producción de plásmido se tomaron alícuotas a distintas densidades ópticas y se les determinó la concentración plasmídica.

5.3.4 Purificación del plásmido pVAX1-LipL32

La purificación del ADN plasmídico se realizó con el kit PureLink™ HQ Midiprep (Invitrogen). Primeramente se equilibró la columna con 10 mL del buffer EQ1. Después se adicionó en un tubo de 50 mL estéril el resuspendido celular y se adicionaron 4 mL de buffer 3 que contenía la ARNasa y se mezcló. Posteriormente se adicionaron 4 mL de buffer L7 de lisis, se mezcló invirtiendo el tubo 5 veces y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 min. Al final de la incubación se adicionaron 4 mL del buffer de precipitación N3, se mezcló y se centrifugó a 15,000 g por 10 min. El sobrenadante del paso anterior se cargó a la columna y se descartó el fluido que caía por gravedad. Se procedió a lavar la columna con 10 mL buffer

de lavado W8 y se descartó el eluido. Una vez que terminó de eluir todo el buffer de lavado se adicionaron 5 mL de buffer de elución E4 para obtener el ADNp en el tubo colector.

Para precipitar el plásmido se adicionaron 3.5 mL de isopropanol, se mezcló y se centrifugó a 12,000 rpm por 30 min a 4° C, y se descartó el sobrenadante. El botón celular se resuspendió con 3 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a 4° C, y se descartó el sobrenadante. Se colocó el tubo a temperatura ambiente por 10 min para eliminar el exceso de etanol en el ADNp y finalmente este se resuspendió con 30 µL de agua (grado PCR). Se determinó la concentración del plásmido purificado por medio del espectrofotómetro ND-1000 (NANODROP) a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm y se calculó el grado de pureza.

5.4 Evaluación de la expresión del gen LipL32 en células de mamífero *in vitro*

Para evaluar la capacidad de expresión del gen, se transfectaron células de mamíferos, se aisló ARNm y se generaron ADN complementario (ADNc).

5.4.1 Transfección del plásmido pVAX1-LipL32 en células MARC 145

Se preparó mediante pases seriados un cultivo de la línea celular de macrófagos MARC-145 (donadas por el Dr. Jesús Hernández, CIAD) en una placa de 24 pozos (NUNC) a una densidad celular de 1×10^6 células/pozo. Las células se mantuvieron en medio D-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, a 37°C, 5% de CO₂ y humedad relativa mayor de 90%, hasta su uso. En un tubo eppendorf de 1.5 mL se adicionó 6 µL de plásmido (pVAX1-LipL32) y 6 µL de Lipofectamina (Invitrogen) y se dejó incubar por 5 min a temperatura ambiente. Esta mezcla se adicionó al pozo correspondiente, posteriormente se le adicionaron 44 µL de medio de cultivo Optimem (Invitrogen) y se dejó incubando por 30 min a temperatura ambiente. Al final de la incubación se adicionó el volumen necesario de Optimem para llevar a 200 µL, posteriormente se incubó por 4 h a 37° C. Después de la incubación se le agregó a cada pozo 1 mL de medio de cultivo DMEM (SIGMA) y se incubó 48 h a 37° C. Al final de la incubación se procedió a despegar las células transfectadas. Primero se realizaron

lavados adicionando 500 μL de PBS estéril a cada pozo y se enjuagó por pipeteo, esto un par de veces. Después se adicionó 100 μL de Tripsina y se incubó a 37° C por 5 min. Posteriormente se adicionaron 500 μL de PBS y se colectó en un tubo eppendorf de 1.5 mL para ser centrifugado a 1,400 rpm por 10 min a 15° C. Por último se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió con 500 μL de Trizol.

5.4.2 Extracción de ARN con Trizol

A la mezcla del paso anterior se le agregaron 200 μL de cloroformo y se mezcló por vortex; se incubó por 3 min a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 10,500 rpm por 15 min a 4° C. Del centrifugado se tomó solo la fase acuosa y se pasó a un nuevo tubo. Se adicionaron 500 μL de isopropanol y se mezcló por inversión y se mantuvo 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó y el botón se resuspendió con 1 mL de etanol al 75% y se mezcló con vortex. Se procedió a centrifugar a 8,500 rpm por 5 min a 4° C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el botón a temperatura ambiente. Por último el botón se resuspendió con 40 μl de agua (grado PCR) y se cuantificó el ARN.

5.4.3 Obtención de ADNc mediante transcripción reversa (RT)

Antes de realizar la RT, el ARN se trató con ADNsa. Primero se tomaron 8 μL de ARN purificado del paso anterior y se pasó a un tubo de 1.5 mL y se adicionó 1 μL de buffer 10x, 1 μL de enzima ADNsa y se incubó por 2.5 h a 37° C. Al final de la incubación se adicionaron 2 μL de EDTA y se calentó a 70° C durante 10 min. Para continuar con la RT se tomaron 8 μL de ARN tratado con ADNsa, 1 μL de dNTPs y 1 μL de oligo dT y se incubó por 5 min a 65° C. De la mezcla anterior se tomaron 8 μL y se colocó en otro tubo al cual se adicionaron 2 μL de buffer RT 10x, 4 μL de MgCl_2 25 mM, DTT 0.1 M y 1 μL de ARNasa OUT; se incubó por 2 min a 42° C. Por último a la mezcla se le adicionaron 0.25 μL de SuperScript RT enzyme y se incubó a 42° C por 50 min y a 70° C por 15 min. Adicionalmente se empleó el sistema Affinity Script (Stratagene): 10 μL de buffer 10x, 1 μL Enzima RT, 3 μL de iniciador gen específico u Oligo dT y 2 μL de ARN (tratado con ADNsa), y 1 μL de agua grado biología molecular. El programa 5 min a 25° C, 15 min 42° C y 5 min 95° C.

5.4.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En un tubo eppendorf de 0.2 mL se depositaron 45 μ L de la mezcla de reactivos, 5 μ L (1 a 500 ng) del ADNc purificado y 2.5 μ L de iniciador sentido (20 μ M) 5-GCTCTAGAATGAAAAAAGTTTCGATTTTGGC-3 y 2.5 μ L de iniciador antisentido (20 μ M) 5-CGGGGTACCTTACTTAGTCGCGTCAGAA-3 a un volumen final de 55 μ L. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador Gene Cyclor™ (BIORAD) bajo el siguiente programa: un ciclo a 94° C por 5 min, seguido de 40 ciclos a 94° C por 15 s, 56° C por 30 s, 72° C por 40 s y una extensión final a 72° C por 10 min. Para demostrar la amplificación del gen LipL32, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%, del producto de PCR, esperando encontrar una banda a los 819 pb. El producto de PCR fue secuenciado en el Genetic Analysis Technology Core (GATC) de la Universidad de Arizona.

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Estandarización de la PCR para la detección del gen LipL32 de *Leptospira*

Se establecieron las condiciones experimentales de la técnica de PCR para amplificar la secuencia completa del gen LipL32 y un fragmento interno de 260 pb, a partir de 6 cepas de referencia de *Leptospira spp* (Figuras 7 y 8). Además se analizaron 34 muestras de suero de pacientes con sospecha de leptospirosis, en las cuales se detectaron como positivos 10 pacientes (29.4%) mediante PCR, de los cuales sólo 3 (8.8%) fueron positivos a la técnica oficial de microaglutinación MAT (Tabla 3).

En el presente trabajo se logró estandarizar una técnica de PCR capaz de evidenciar la presencia de la bacteria *Leptospira* en cepas de referencia y muestras clínicas de humanos, al igual que otros estudios donde se ha logrado el mismo fin (Aviat et al., 2008; Luchini et al., 2008; Nassi et al., 2003; Reitstetter, 2006).

También se han reportado otros trabajos donde se comparó la eficiencia y sensibilidad de la PCR contra técnicas serológicas como ELISA, MAT y SAT (Céspedes et al., 2007; de Abreu Fonseca et al., 2006; Ooteman et al., 2006). Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con los reportados en los trabajos anteriormente mencionados donde se ha llegado a la conclusión de que la PCR muestra mejores resultados en los 8 primeros días de iniciados los síntomas en comparación de las otras técnicas. Esto permitiría tener una mejor intervención en la evolución de la enfermedad en una etapa más temprana.

Debido a la similitud de síntomas de la leptospirosis con otros padecimientos, en muchos laboratorios se realiza diagnóstico diferencial de enfermedades febriles, dependiendo de la región, como: leptospira, dengue, rickettsia, brucela, fiebre amarilla, hepatitis viral, etc. (Plank and Dean, 2000). Se ha reportado en estudios previos la existencia de casos de pacientes con leptospirosis y coinfección con otras enfermedades como dengue y rickettsia (Flannery and Pereira, 2001; Levett et al., 2000; Navarrete-Espinosa et al., 2006; Park et al., 1989). Con la ayuda de la PCR se pudo detectar la presencia de dos pacientes con leptospirosis (PCR positivos) que padecían una coinfección con dengue y rickettsia respectivamente (Tabla

3). Dicha coinfección no pudo ser detectada con los métodos tradicionales debido a las limitantes en la sensibilidad de los mismos, por lo que esto es otro argumento que soporta el uso de las técnicas moleculares para apoyar el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

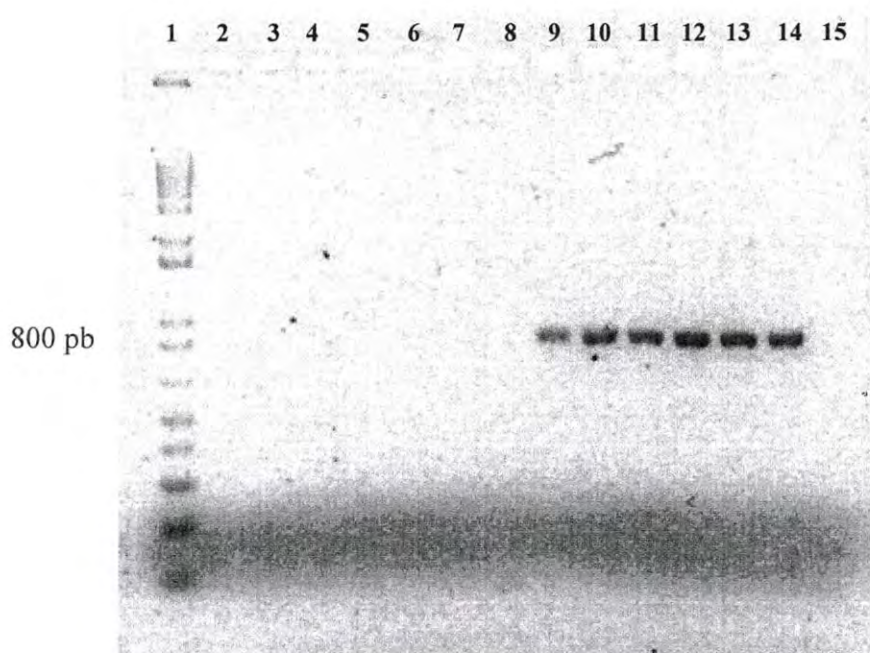


Figura 7. Perfil electroforético en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR de la amplificación del gen LipL32 de *Leptospira spp.* 1) marcador de peso molecular; 9-14) serovariedades: *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *pyrogenes*, *automnalis*, *cynopteri* y *hardjo*, (819pb); 15) control negativo.

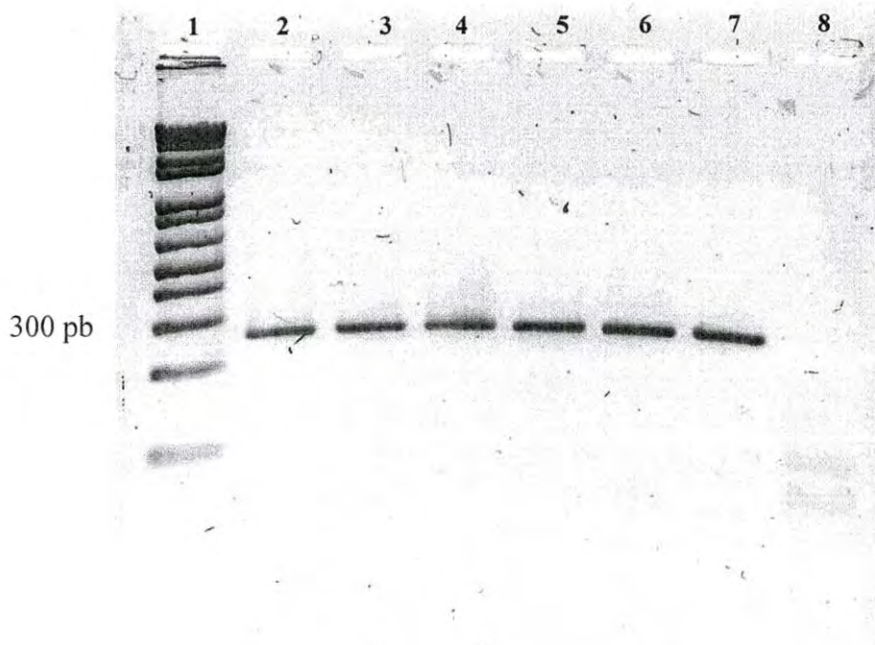


Figura 8. Perfil electroforético en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR de un fragmento interno del gen LipL32 de *Leptospira spp.* 1) marcador de peso molecular; 2-7) serovariedades: *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *pyrogenes*, *automnalis*, *cynopteri* y *hardjo* (260pb); 8) control negativo.

Tabla 3. Datos clínicos de los pacientes positivos a leptospirosis mediante MAT y PCR.

Paciente	Días de iniciado los síntomas al momento de la toma de muestra	Síntomas	Co-infección	MAT	PCR
4	7	Fiebre (38° C), cefalea, mialgias, exantema, vomito, nauseas, dolor abdominal, congestión nasal, tos, inflamación de párpados, desorientación, escape de líquidos, hemorragia, petequias, defunción .	No	-	+
5	4	Fiebre (38° C), cefalea, mialgias, artralgias, dolor retroocular, vomito, escalofríos, fotofobia, diarrea, conjuntivitis, faringitis, disnea, ictericia.	No	<i>canicola</i> 1:1280 <i>icterohaemorrhagiae</i> 1:640 <i>pyrogenes</i> 1:320	+
11	2	Fiebre (38,2° C), cefalea, mialgias, artralgias, dolor retroocular, exantema, prurito, fotofobia, alteraciones del gusto	Dengue	-	+
13	2	Fiebre, cefalea, mialgias, artralgias	No	Indeterminado (1:80)	+
18	6	Fiebre (39° C), cefalea, mialgias, artralgias, dolor retroocular, vomito, diarrea, disnea	No	-	+
21	0	Fiebre, cefalea, mialgias, artralgias, dolor retroocular, escalofríos, fotofobia, conjuntivitis, mareos	No	-	+
24	47	Fiebre (38° C), cefalea, mialgias, artralgias, dolor abdominal, esplenomegalia, hipoxia, equimosis	Rickettsia	Indeterminado (1:160)	+
29	2	Fiebre, cefalea, mialgias, artralgias, dolor retroocular, escalofríos, conjuntivitis, vomito, nauseas, fotofobia, dolor abdominal, congestión nasal, faringitis, rinitis, debilidad muscular,	No	-	+
33	3	Fiebre (38° C), cefalea, mialgias, artralgias, escalofríos, fotofobia, conjuntivitis, tos, nauseas.	No	-	+
34	4	Fiebre (38° C), cefalea, mialgias, artralgias, dolor retroocular, escalofríos, conjuntivitis, vomito, nauseas, fotofobia, dolor abdominal, faringitis, rinitis, prurito, exantema, alteraciones del gusto, disnea, hemorragia.	No	-	+

6.2 Clonación del gen LipL32 en un vector de expresión

Inicialmente se tenía planteado amplificar el gen completo LipL32 y este clonarlo, a partir de muestras clínicas, sin embargo esto no fue posible debido a una limitada cantidad de muestra. Por lo que se decidió realizar la amplificación del gen y procesos subsecuentes a partir de una de las cepas de referencia empleadas para la estandarización de la PCR. Estas cepas de referencia representan las serovariedades más frecuentes para la región y son las que se emplean de referencia en el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Sonora, para el diagnóstico serológico. Se partió del amplicon LipL32 de la serovariedad *icterohaemorrhagiae* RGA, para ser clonado en el vector pVAX1 mediante sitios de restricción específicos para las enzimas Xba1 y Kpn 1. El producto de clonación pVAX1-LipL32 presentó un peso esperado de 3819 pb y el producto de la digestión por ambas enzimas (Xba1 y Kpn 1) presentó un peso esperado de 819 pb (Figura 9).



Figura 9. Perfil electroforético en gel de agarosa al 2% del perfil de restricción del vector pVAX1-LipL32. 1) marcador de peso molecular; 2) gen LipL32; 3) vector pVAX1; 4-7) ligación pVAX1-LipL32; 8-11) digestión del producto de ligación.

Para verificar la adecuada clonación del gen LipL32 en el vector pVAX1 se realizó la secuenciación del producto de clonación, empleando el oligonucleótido T7 forward. Con la secuencia obtenida se realizó un alineamiento con 4 distintas secuencias de LipL32 de especies de *Leptospira* obtenidas de la base de datos del GenBank. Los análisis se realizaron con el programa en línea Clustal W2, (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) (Figura 10). Se encontró una identidad de nucleótidos del 94-99% comparada con otras cepas de *Leptospira* spp, (Tabla 4), mientras que el porcentaje de identidad de residuos de aminoácidos, fue de 98-100%. Esto refleja el alto nivel de conservación que presenta esta lipoproteína de superficie.

```

pVAX-LipL32      CNCGACNCGTTACTTAGCTTGGTCCCCATGGGAAAACCTTTCGATTTTGGCTATCTCCGTT 60
AY609324.1      -----ATGAAAAAACTTTCGATTTTGGCTATCTCCGTT 33
GU183106.1      -----ATGAAAAAACTTTCGATTTTGGCTATCTCCGTT 33
AY609322.1      -----ATGAAAAAACTTTCGATTTTGGCGATCTCCGCT 33
AY461925.1      -----GAAAAAACTTTCGATTTTGGCTATCTCCGTT 31
                * *****

pVAX-LipL32      GCACTCTTTGCAAGCATTACCGCTTGTGGTGCCTTCGGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGC 120
AY609324.1      GCACTCTTTGCAAGCATTACCGCTTGTGGTGCCTTCGGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGC 93
GU183106.1      GCACTCTTTGCAAGCATTACCGCTTGTGGTGCCTTCGGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGC 93
AY609322.1      GCACTCTTTGCAAGCATTACCGCTTGTGGTGCCTTCGGTGGTTCGCAAGCCTTAAAAAGC 93
AY461925.1      GCACTCTTTGCAAGCATTACCGCTTGTGGTGCCTTCGGTGGTCTGCCAAGCCTTAAAAAGC 91
                *****

pVAX-LipL32      TCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATCCCAGGGACAAACGAAACCGTAAAAACGTTACTT 180
AY609324.1      TCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATCCCAGGGACAAACGAAACCGTAAAAACGTTACTT 153
GU183106.1      TCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATCCCAGGGACAAACGAAACCGTAAAAACGTTACTT 153
AY609322.1      TCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATCCCAGGAAACAAACGAAACCGTAAAAACGTTCTT 153
AY461925.1      TCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATCCCAGGAAACAAACGAAACCCATAAAAAACGTTCTT 151
                *****

pVAX-LipL32      CCCTACGGATCTGTGATCAACTATTACGGATACGTAAGCCAGGACAAGCGCCGGACGGT 240
AY609324.1      CCCTACGGATCTGTGATCAACTATTACGGATACGTAAGCCAGGACAAGCGCCGGACGGT 213
GU183106.1      CCCTACGGATCTGTGATCAACTATTACGGATACGTAAGCCAGGACAAGCGCCGGACGGT 213
AY609322.1      CCCTATGGATCTGTGATCAACTATTACGGATATGTAAGCCAGGACAAGCGCCGGACGGT 213
AY461925.1      CCCATATGGATCTGTGATCAACTATTACGGATACATAAAGCCAGGACAAGCGCCGGATGGC 211
                *****

pVAX-LipL32      TTAGTCGATGGAACAAAAAGCATACTATCTCTATGTTTGGATTCCGCGTAATCGCT 300
AY609324.1      TTAGTCGATGGAACAAAAAGCATACTATCTCTATGTTTGGATTCCGCGTAATCGCT 273
GU183106.1      TTAGTCGATGGAACAAAAAGCATACTATCTCTATGTTTGGATTCCGCGTAATCGCT 273
AY609322.1      TTAGTCGACGGAACAAAAAGCATACTATCTCTATGTTTGGATCCAGCTGTAATCGCT 273
AY461925.1      TTAGTCGACGGAACAAAAAGCATACTATCTCTATGTTTGGATTCCAGCTGTAATCGCT 271
                *****

pVAX-LipL32      GAAATGGGAGTTCGTATGATTTCCCAACAGGCAGAAATCGGTGAGCCAGGCGACGGAGAC 360
AY609324.1      GAAATGGGAGTTCGTATGATTTCCCAACAGGCAGAAATCGGTGAGCCAGGCGACGGAGAC 333
GU183106.1      GAAATGGGAGTTCGTATGATTTCCCAACAGGCAGAAATCGGTGAGCCAGGCGACGGAGAC 333
AY609322.1      GAAATGGGAGTTCGTATGATTTCCCAACAGGCAGAAATCGGGGAACCGGCGACGGAGAC 333
AY461925.1      GAAATGGGAGTTCGTATGATTTCCCAACAGGCAGAAATCGGTGAACCGGCGACGGAGAT 331
                *****

pVAX-LipL32      TTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCCAGAAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTT 420
AY609324.1      TTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCCAGAAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTT 393
GU183106.1      TTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCCAGAAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTT 393

```

AY609322.1 TTAGTAAGCGATGCTTTCAAAGCGGCAACCCCGGAAGAAAATCAATGCCACATTGGTTT 393
 AY461925.1 TTAGTAAGTGATGCGTTCAAAGCGGCAACCCCGAAGAAAATCAATGCCACATTGGTTT 391
 ***** ** ** ***** **

pVAX-LipL32 GATACTTGGATCCGTGTAGAAAAGAAATGTCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGCCAAAGCT 480
 AY609324.1 GATACTTGGATCCGTGTAGAAAAGAAATGTCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGCCAAAGCT 453
 GU183106.1 GATACTTGGATCCGTGTAGAAAAGAAATGTCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGCCAAAGCT 453
 AY609322.1 GATACCTGGATCCGTGTAGAAAAGAAATGTCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGCCAAAGCT 453
 AY461925.1 GATACTTGGATCCGTGTAGAAAAGAAATGTCGGCAATTATGCCCGACCAAATCGCTAAAGCA 451
 ***** ** ***** **

pVAX-LipL32 GCGAAAGCAAACCAGTTCAAATAATTGGACGATGATGATGATGGTGACGATACTTATAAA 540
 AY609324.1 GCGAAAGCAAACCAGTTCAAATAATTGGACGATGATGATGATGGTGACGATACTTATAAA 513
 GU183106.1 GCGAAAGCAAACCAGTTCAAATAATTGGACGATGATGATGATGGTGACGATACTTATAAA 513
 AY609322.1 GCGAAAGCAAACCAGTTCAAATAATTGGACGATGATGATGATGGTGATGATACTTATAAA 513
 AY461925.1 GCGAAAGCAAACCAGTTCAAATAATTGGGCTATGACGATGATGGTGATGATACTTATAAG 511
 ***** ** ***** * *****

pVAX-LipL32 GAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAA 600
 AY609324.1 GAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAA 573
 GU183106.1 GAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAA 573
 AY609322.1 GAAGAGAGACACAATAAATACAACCTCTTACTAGAATCAAGATCCCAAATCCTCCAAAA 573
 AY461925.1 GAAGAGAGACACAACAATAACAACCTCTTATTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAA 571
 ***** ** *****

pVAX-LipL32 TCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGACACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGA 660
 AY609324.1 TCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGACACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGA 633
 GU183106.1 TCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGACACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGA 633
 AY609322.1 TCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGATACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGA 633
 AY461925.1 TCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGATACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGA 631
 ***** *****

pVAX-LipL32 ATTTCTTTCACCTACCTACAACCAGGTGAAGTGAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGT 720
 AY609324.1 ATTTCTTTCACCTACCTACAACCAGGTGAAGTGAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGT 693
 GU183106.1 ATTTCTTTCACCTACCTATAAACCAGGTGAAGTGAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGT 693
 AY609322.1 ATTTCTTTCACCTACCTACAACCAGGTGAAGTGAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGT 693
 AY461925.1 ATTTCTTTCACCTACCTACAACCAGGTGAAGTGAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGT 691
 ***** *****

pVAX-LipL32 CTGCTTTTCCCACCAGGTATTCAGGTGTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAA 780
 AY609324.1 CTGCTTTTCCCACCAGGTATTCAGGTGTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAA 753
 GU183106.1 CTGCTTTTCCCACCAGGTATTCAGGTGTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAA 753
 AY609322.1 CTGCTTTTCCCACCAGGTATTCAGGTGTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAA 753
 AY461925.1 CTGCTTTTCCCACCAGGTATTCAGGTGTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAGGAA 751
 ***** *****

pVAX-LipL32 TTGCAAAAACAAGCTATCGCTGCTGAAGAGTCTTTGAAAAAAGCTGCTTCTGACGCGACT 840
 AY609324.1 TTGCAAAAACAAGCTATCGCTGCTGAAGAGTCTTTGAAAAAAGCTGCTTCTGACGCGACT 813
 GU183106.1 TTGCAAAAACAAGCTATCGCTGCTGAAGAGTCTTTGAAAAAAGCTGCTTCTGACGCGACT 813
 AY609322.1 CTGCAAAAACAAGCTATCGCCGCCGAAGAATCTTTGAAAAAAGCTGCTTCTGACGCGACT 813
 AY461925.1 CTGCAAAAACAAGCTATCGCTGCTGAAGAGTCTTTGAAAAAAGCCGC----- 798
 ***** ** ***** **

pVAX-LipL32 AAGTAATCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGC 900
 AY609324.1 AAGTAA----- 819
 GU183106.1 AAGTA-TCTGTAA----- 825
 AY609322.1 AAGTAA----- 819
 AY461925.1 -----

Figura 10. Alineamiento de la secuencia del plásmido pVAX-LipL32 y distintas secuencias de LipL32 del género *Leptospira*.

Tabla 4. Matriz de identidad de nucleótidos del gen LipL32 clonado en el vector pVAX-1

Secuencia	AY609324.1 ^a	GU183106.1 ^b	AY609322.1 ^c	AY461925.1 ^d
pVAX-LipL32*	99%	98%	95%	94%

*pVAX-LipL32: secuencia del gen LipL32 obtenida en este estudio a partir de *Leptospira interrogans* serovariedad *Icterohaemorrhagiae* cepa RGA

^aAY609324.1 : *Leptospira interrogans* serovariedad *autumnalis*

^bGU183106.1 : *Leptospira interrogans* serovariedad *icterohaemorrhagiae*

^cAY609322.1 : *Leptospira borgpetersenii* serovariedad *ballum*

^dAY461925.1 : *Leptospira santarosai* strain CZ299

6.3 Producción del plásmido a escala matraz

La curva de crecimiento de *E. coli* con el plásmido pVAX1-LipL32 prácticamente no presenta una fase lag, esto es debido al empleo de un buen inóculo (Figura 11). El crecimiento exponencial tuvo una duración aproximada de 6 h. La curva continua de la figura representa el ajuste del modelo de crecimiento con una velocidad específica de crecimiento (μ) de 1.1 h^{-1} . Este valor es típico para cultivos *E. coli* en matraz.

Además se determinó la cantidad y concentración de plásmido en distintas etapas del cultivo (Figura 12). Se obtuvo la mayor cantidad de plásmido ($648 \mu\text{g}$) a las 6 h de incubación y un rendimiento volumétrico máximo de 81 mg/L al mismo tiempo. Estos resultados concuerdan con lo descrito en otros trabajos realizados a la misma escala de matraz donde se ha obtenido rendimientos volumétricos que van desde los 6.9 hasta los 74 mg/L (Danquah and Forde, 2007; O'Kennedy et al., 2000; Prather et al., 2003; Wang et al., 2001; Xu et al., 2005; Zheng et al., 2007).

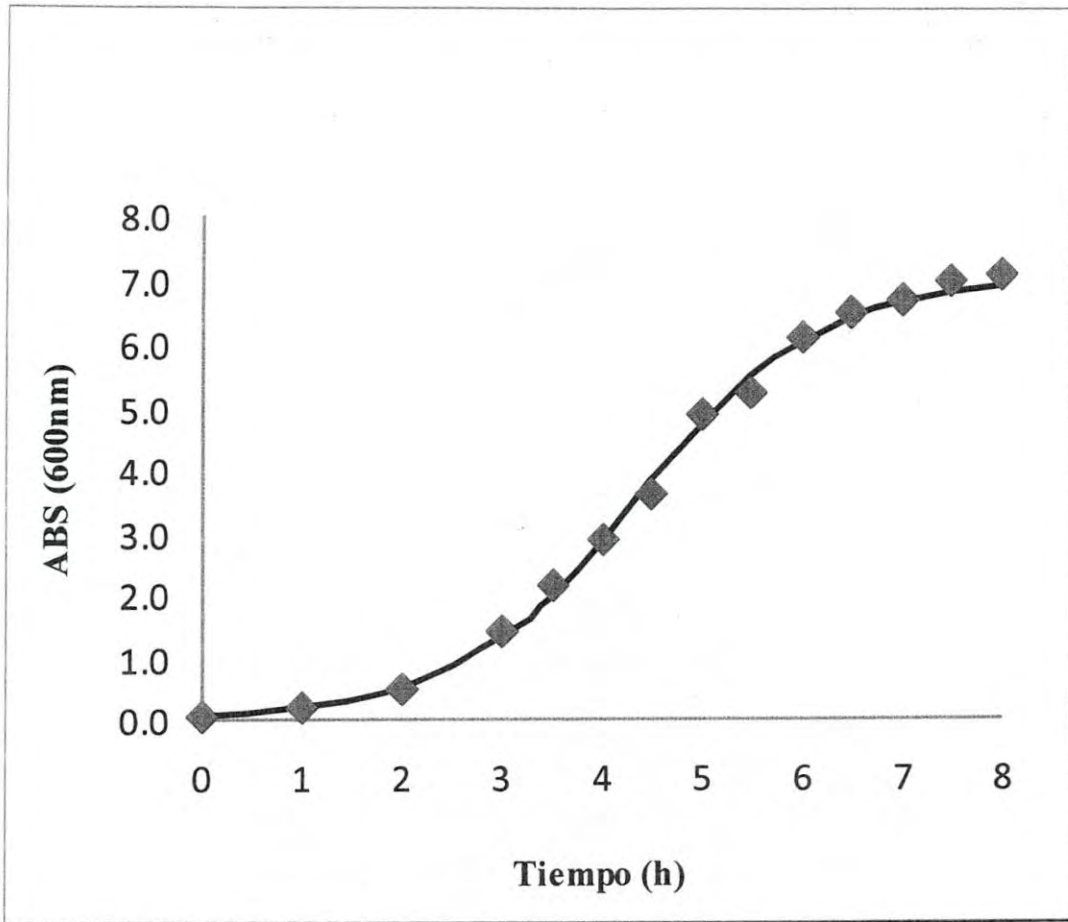


Figura 11. Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* cultivada por 8 horas en medio TB.
◆ Muestra los datos experimentales. — Muestra el Modelo teórico.

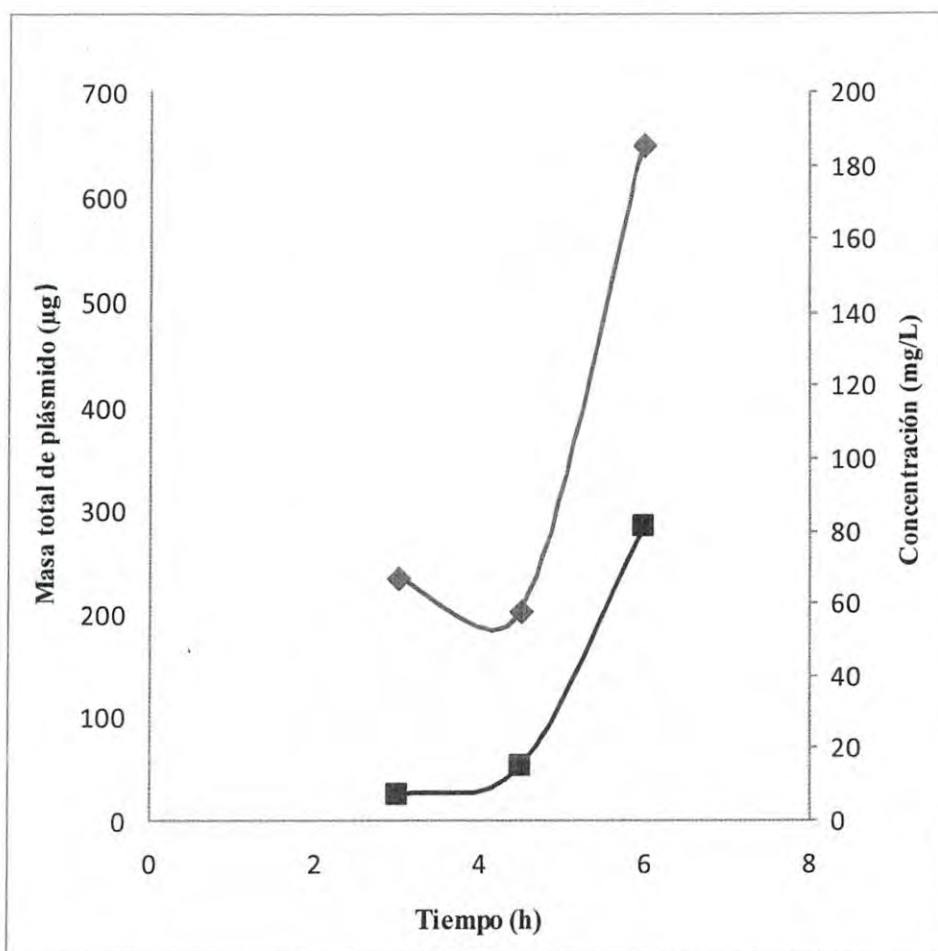


Figura 12. Cinética de producción de ADN plasmídico.

—◆— Muestra la masa total de plásmido obtenida a distintos tiempos. —■— Muestra el rendimiento volumétrico obtenido a distintos tiempos.

6.4 Expresión del gen LipL32 en células de mamífero *in vitro*

Con el objetivo de verificar la expresión del gen LipL32 a través de la detección de ARNm como una medida indirecta de la producción de la proteína en células eucariotas, se procedió a realizar ensayos de transfección de células MARC-145 con Lipofectamina 2000. Este sistema ya se había empleado con éxito para la expresión de otras proteínas por lo que fue tomado como punto de partida para cumplir con nuestro objetivo. Se detectó la expresión del

gen LipL32 por RT-PCR convencional a partir del ARN total extraído de las células MARC-145 transfectadas. En este ensayo se realizó la síntesis del ADNc con el sistema SuperScript, empleando oligo dT y oligonucleótido gen específico, y demás controles del ensayo (Figura 13). Fue posible comprobar la amplificación de un fragmento del tamaño esperado usando el oligo dT, no así con el oligonucleótido específico, por lo que se consideró utilizar otro sistema para la transcripción reversa más sensible (Affinity Script).

Empleando las mismas muestras de ARN, se realizó la RT con el sistema AffinityScript y posteriormente PCR, y se observó un incremento en la sensibilidad, observando amplificación con ambos iniciadores (Figura 14). El producto de RT-PCR amplificado fue secuenciado obteniéndose una secuencia parcial de 819 nt (pVAX-LipL32c) la cual fue alineada con la secuencia del plásmido pVAX-LipL32 previamente analizada junto con las otras 4 secuencias del género *Leptospira* anteriormente mostradas (Figura 15). Se encontró una identidad de nucleótidos del 94-99% comparada con otras cepas de *Leptospira* de 94-100% (Tabla 5).

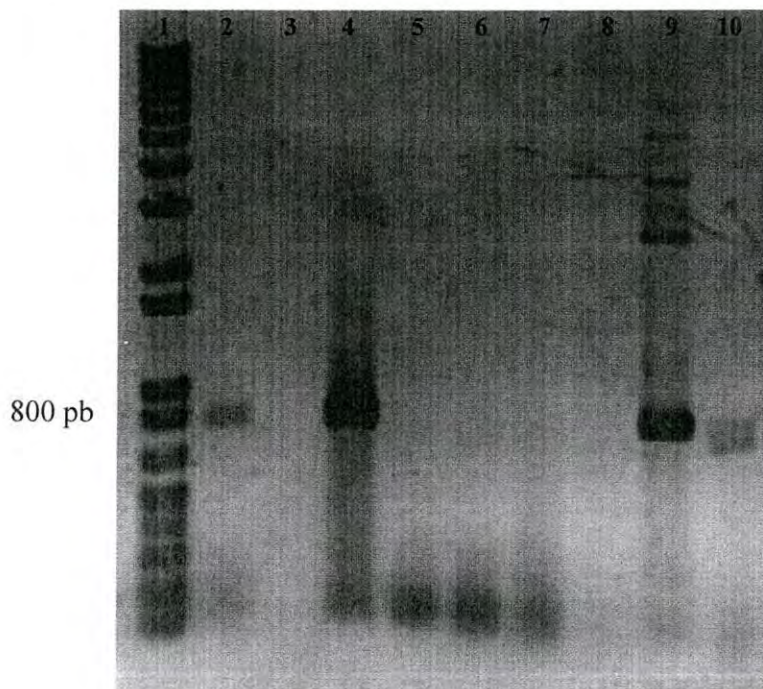


Figura 13. Perfil electroforético en gel de agarosa 2% de los productos de PCR del ensayo de transfección. La transcripción reversa se realizó empleando el sistema Super Script (Invitrogen). 1) marcador de peso molecular; 2) PCR *control positivo* (pVAX-LipL32); 3) PCR a partir de ARN Marc *sin transfectar*; 4) PCR de ARN de *células transfectadas sin ADNasa*; 5) PCR de ARN de *células transfectadas, y tratado con ADNasa*; 6) RT-PCR con oligo específico, *células transfectadas*; 7) RT-PCR con oligo específico, *células sin transfectar*; 8) RT-PCR *control negativo* (sin templado); 9) plásmido pVAX-LipL32; 10) RT-PCR con oligo dT, *células transfectadas*.

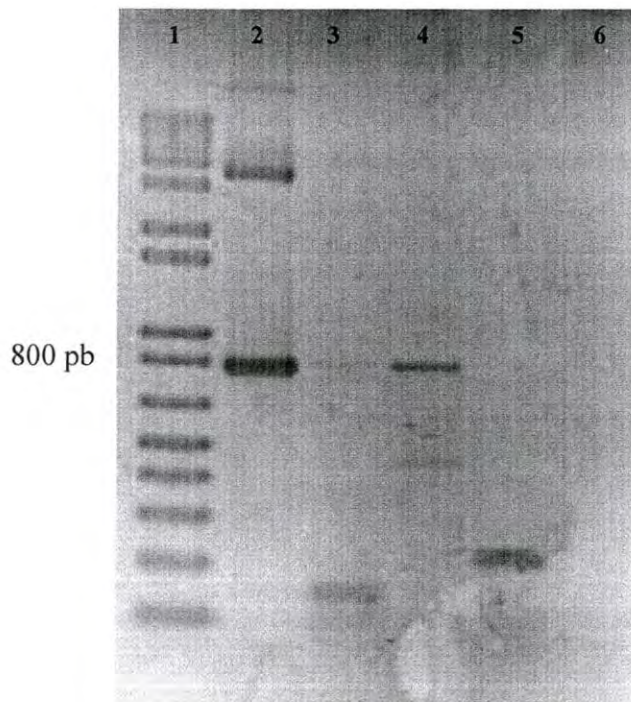


Figura 14. Perfil electroforético en gel de agarosa 2% de los productos de RT-PCR del ensayo de transfección. La transcripción reversa fue realizada con el sistema AffinityScript (STRATAGENE). 1) marcador de peso molecular; 2) *control positivo* (pVAX-LipL32); 3) LipL32 con iniciador gen específico Rv; 4) LipL32 con iniciador oligo dT; 5) gen constitutivo GAPDH; 6) control negativo (sin templado).


```

pVAX-LipL32c -----ATGGGAAAAC TTCGATTTGGCTATCTCCGTT 33
pVAX-LipL32  CNCGACNCGTTACTTAGCTTGGTCCCATGGGAAAAC TTCGATTTGGCTATCTCCGTT 60
AY609324.1 -----ATGAAAAAACT TTCGATTTGGCTATCTCCGTT 33
GU183106.1 -----ATGAAAAAACT TTCGATTTGGCTATCTCCGTT 33
AY609322.1 -----ATGAAAAAACT TTCGATTTGGCTATCTCCGTT 33
AY461925.1 -----GAAAAAACT TTCGATTTGGCTATCTCCGTT 31
* * * * *

pVAX-LipL32c GCACTCTTTGCAAGCATTACCGCTTGTGGTGCTTTCGGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGC 93
pVAX-LipL32  GCACTCTTTGCAAGCATTACCGCTTGTGGTGCTTTCGGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGC 120
AY609324.1 GCACTCTTTGCAAGCATTACCGCTTGTGGTGCTTTCGGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGC 93
GU183106.1 GCACTCTTTGCAAGCATTACCGCTTGTGGTGCTTTCGGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGC 93
AY609322.1 GCACTCTTTGCAAGCATTACCGCTTGTGGTGCTTTCGGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGC 93
AY461925.1 GCACTCTTTGCAAGCATTACCGCTTGTGGTGCTTTCGGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGC 91
* * * * *

pVAX-LipL32c TCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATCCCAGGGACAACGAAACCGTAAAAACGTTACTT 153
pVAX-LipL32  TCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATCCCAGGGACAACGAAACCGTAAAAACGTTACTT 180
AY609324.1 TCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATCCCAGGGACAACGAAACCGTAAAAACGTTACTT 153
GU183106.1 TCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATCCCAGGGACAACGAAACCGTAAAAACGTTACTT 153
AY609322.1 TCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATCCCAGGGACAACGAAACCGTAAAAACGTTACTT 153
AY461925.1 TCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATCCCAGGGACAACGAAACCGTAAAAACGTTACTT 151
* * * * *

pVAX-LipL32c CCCTACGGATCTGTGATCAACTATTACGGATACGTAAGCCAGGACAAGCGCCGGACGGT 213
pVAX-LipL32  CCCTACGGATCTGTGATCAACTATTACGGATACGTAAGCCAGGACAAGCGCCGGACGGT 240
AY609324.1 CCCTACGGATCTGTGATCAACTATTACGGATACGTAAGCCAGGACAAGCGCCGGACGGT 213
GU183106.1 CCCTACGGATCTGTGATCAACTATTACGGATACGTAAGCCAGGACAAGCGCCGGACGGT 213
AY609322.1 CCCTATGGATCTGTGATCAACTATTACGGATATGTAAGCCAGGACAAGCGCCGGACGGT 213
AY461925.1 CCCTATGGATCTGTGATCAACTATTACGGATACATAAAGCCAGGACAAGCGCCGGATGGC 211
* * * * *

pVAX-LipL32c TTAGTCGATGGAACAACAAAAAGCATACTATCTCTATGTTGGATTCCCTGCCGTAATCGCT 273
pVAX-LipL32  TTAGTCGATGGAACAACAAAAAGCATACTATCTCTATGTTGGATTCCCTGCCGTAATCGCT 300
AY609324.1 TTAGTCGATGGAACAACAAAAAGCATACTATCTCTATGTTGGATTCCCTGCCGTAATCGCT 273
GU183106.1 TTAGTCGATGGAACAACAAAAAGCATACTATCTCTATGTTGGATTCCCTGCCGTAATCGCT 273
AY609322.1 TTAGTCGACGGAACAACAAAAAGCATACTATCTCTATGTTGGATTCCCTGCCGTAATCGCT 273
AY461925.1 TTAGTCGACGGAACAACAAAAAGCATACTATCTCTATGTTGGATTCCCTGCCGTAATCGCT 271
* * * * *

pVAX-LipL32c GAAATGGGAGTTCGTATGATTTCCCAACAGGCGAAATCGGTGAGCCAGGCGACGGAGAC 333
pVAX-LipL32  GAAATGGGAGTTCGTATGATTTCCCAACAGGCGAAATCGGTGAGCCAGGCGACGGAGAC 360
AY609324.1 GAAATGGGAGTTCGTATGATTTCCCAACAGGCGAAATCGGTGAGCCAGGCGACGGAGAC 333
GU183106.1 GAAATGGGAGTTCGTATGATTTCCCAACAGGCGAAATCGGTGAGCCAGGCGACGGAGAC 333
AY609322.1 GAAATGGGAGTTCGTATGATTTCCCAACAGGCGAAATCGGGGAACAGGCGACGGAGAC 333
AY461925.1 GAAATGGGAGTTCGTATGATTTCCCAACAGGCGAAATCGGTGAACAGGCGACGGAGAT 331
* * * * *

pVAX-LipL32c TTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCAGAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTT 393
pVAX-LipL32  TTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCAGAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTT 420
AY609324.1 TTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCAGAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTT 393
GU183106.1 TTAGTAAGCGACGCTTTCAAAGCGGCTACCCAGAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTT 393
AY609322.1 TTAGTAAGCGATGCTTTCAAAGCGGCAACCCGGAAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTT 393
AY461925.1 TTAGTAAGTGTATGCGTTCAAAGCGGCAACCCAGAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTT 391
* * * * *

pVAX-LipL32c GATACTTGGATCCGTGTAGAAAGAATGTCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGCCAAAGCT 453
pVAX-LipL32  GATACTTGGATCCGTGTAGAAAGAATGTCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGCCAAAGCT 480
AY609324.1 GATACTTGGATCCGTGTAGAAAGAATGTCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGCCAAAGCT 453
GU183106.1 GATACTTGGATCCGTGTAGAAAGAATGTCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGCCAAAGCT 453
AY609322.1 GATACTTGGATCCGTGTAGAAAGAATGTCGGCGATTATGCCTGACCAAATCGCCAAAGCT 453
AY461925.1 GATACTTGGATCCGTGCTGAAAGAATGTCGGCAATTATGCCGACCAAATCGCTAAAGCA 451

```



```

*****
pVAX-LipL32c  GCGAAAGCAAACCAGTTCAAAAATTGGACGATGATGATGATGGTGACGATACTTATAAA 513
pVAX-LipL32  GCGAAAGCAAACCAGTTCAAAAATTGGACGATGATGATGATGGTGACGATACTTATAAA 540
AY609324.1   GCGAAAGCAAACCAGTTCAAAAATTGGACGATGATGATGATGGTGACGATACTTATAAA 513
GU183106.1   GCGAAAGCAAACCAGTTCAAAAATTGGACGATGATGATGATGGTGACGATACTTATAAA 513
AY609322.1   GCGAAAGCAAACCAGTTCAAAAATTGGACGATGATGATGATGGTGATGATACTTATAAA 513
AY461925.1   GCGAAAGCGAAACCAGTTCAAAAATTGGGCTATGACGATGATGGTGATGATACTTATAAG 511
*****

pVAX-LipL32c  GAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCTCTTACTAGAAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAA 573
pVAX-LipL32  GAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCTCTTACTAGAAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAA 600
AY609324.1   GAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCTCTTACTAGAAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAA 573
GU183106.1   GAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCTCTTACTAGAAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAA 573
AY609322.1   GAAGAGAGACACAACAATATACTCTCTTACTAGAAATCAAGATCCCAAATCCTCCAAAA 573
AY461925.1   GAAGAGAGACACAACAATATACTCTCTTATTAGAAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAA 571
*****

pVAX-LipL32c  TCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGACACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGA 633
pVAX-LipL32  TCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGACACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGA 660
AY609324.1   TCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGACACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGA 633
GU183106.1   TCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGACACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGA 633
AY609322.1   TCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGATACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGA 633
AY461925.1   TCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGATACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGA 631
*****

pVAX-LipL32c  ATTTCTTTCACTACCTACAACCAGGTGAAGTGAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGT 693
pVAX-LipL32  ATTTCTTTCACTACCTACAACCAGGTGAAGTGAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGT 720
AY609324.1   ATTTCTTTCACTACCTACAACCAGGTGAAGTGAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGT 693
GU183106.1   ATTTCTTTCACTACCTATAAACCAGGTGAAGTGAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGT 693
AY609322.1   ATTTCTTTCACTACCTACAACCAGGTGAAGTGAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGT 693
AY461925.1   ATTTCTTTCACTACCTACAACCAGGTGAAGTGAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGT 691
*****

pVAX-LipL32c  CTGCTTTTCCCACCAGGTATTCCAGGTGTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAA 753
pVAX-LipL32  CTGCTTTTCCCACCAGGTATTCCAGGTGTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAA 780
AY609324.1   CTGCTTTTCCCACCAGGTATTCCAGGTGTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAA 753
GU183106.1   CTGCTTTTCCCACCAGGTATTCCAGGTGTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAA 753
AY609322.1   CTGCTTTTCCCACCAGGTATTCCAGGTGTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAA 753
AY461925.1   CTGCTTTTCCCACCAGGTATTCCAGGTGTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAGGAA 751
*****

pVAX-LipL32c  TTGCAAAAACAAGCTATCGCTGCTGAAGAGTCTTTGAAAAAAGCTGCTTCTGACGCGACT 813
pVAX-LipL32  TTGCAAAAACAAGCTATCGCTGCTGAAGAGTCTTTGAAAAAAGCTGCTTCTGACGCGACT 840
AY609324.1   TTGCAAAAACAAGCTATCGCTGCTGAAGAGTCTTTGAAAAAAGCTGCTTCTGACGCGACT 813
GU183106.1   TTGCAAAAACAAGCTATCGCTGCTGAAGAGTCTTTGAAAAAAGCTGCTTCTGACGCGACT 813
AY609322.1   CTGCAAAAACAAGCTATCGCCGCCGAAGAATCTTTGAAAAAAGCTGCTTCTGACGCGACT 813
AY461925.1   CTGCAAAAACAAGCTATCGCTGCTGAAGAGTCTTTGAAAAAAGCCGC----- 798
*****

pVAX-LipL32c  AAGTAA----- 819
pVAX-LipL32  AAGTAATCTAGAGGGCCCGTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGC 900
AY609324.1   AAGTAA----- 819
GU183106.1   AAGTATCTGTAA----- 825
AY609322.1   AAGTAA----- 819
AY461925.1   -----

```

Figura 15. Alineamiento de la secuencia del gen LipL32 expresado en células MARC 145 y distintas secuencias del género *Leptospira*.

```

***** ** *****
pVAX-LipL32c      GCGAAAGCAAACCAGTTCAAAAATTGGACGATGATGATGATGGTGACGATACTTATAAA 513
pVAX-LipL32      GCGAAAGCAAACCAGTTCAAAAATTGGACGATGATGATGATGGTGACGATACTTATAAA 540
AY609324.1      GCGAAAGCAAACCAGTTCAAAAATTGGACGATGATGATGATGGTGACGATACTTATAAA 513
GU183106.1      GCGAAAGCAAACCAGTTCAAAAATTGGACGATGATGATGATGGTGACGATACTTATAAA 513
AY609322.1      GCGAAAGCAAACCAGTTCAAAAATTGGACGATGATGATGATGGTGATGATACTTATAAA 513
AY461925.1      GCGAAAGCGAAACCAGTTCAAAAATTGGGCTATGACGATGATGGTGATGATACTTATAAG 511
***** ** *****

pVAX-LipL32c      GAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAA 573
pVAX-LipL32      GAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAA 600
AY609324.1      GAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAA 573
GU183106.1      GAAGAGAGACACAACAAGTACAACCTCTTACTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAA 573
AY609322.1      GAAGAGAGACACAATAAATACAACCTCTTACTAGAATCAAGATCCCAATCCTCCAAAA 573
AY461925.1      GAAGAGAGACACAACAATAACAACCTCTTATTAGAATCAAGATCCCTAATCCTCCAAAA 571
***** ** *****

pVAX-LipL32c      TCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGACACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGA 633
pVAX-LipL32      TCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGACACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGA 660
AY609324.1      TCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGACACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGA 633
GU183106.1      TCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGACACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGA 633
AY609322.1      TCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGATACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGA 633
AY461925.1      TCTTTTGACGATCTGAAAAACATCGATACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGA 631
***** ** *****

pVAX-LipL32c      ATTTCTTTCACCTACCTACAACCAGGTGAAGTGAAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGT 693
pVAX-LipL32      ATTTCTTTCACCTACCTACAACCAGGTGAAGTGAAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGT 720
AY609324.1      ATTTCTTTCACCTACCTACAACCAGGTGAAGTGAAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGT 693
GU183106.1      ATTTCTTTCACCTATAAACCAGGTGAAGTGAAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGT 693
AY609322.1      ATTTCTTTCACCTACCTACAACCAGGTGAAGTGAAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGT 693
AY461925.1      ATTTCTTTCACCTACCTACAACCAGGTGAAGTGAAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGT 691
***** ** *****

pVAX-LipL32c      CTGCTTTTCCCACCAGGTATTCCAGGTGTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAA 753
pVAX-LipL32      CTGCTTTTCCCACCAGGTATTCCAGGTGTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAA 780
AY609324.1      CTGCTTTTCCCACCAGGTATTCCAGGTGTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAA 753
GU183106.1      CTGCTTTTCCCACCAGGTATTCCAGGTGTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAAGAA 753
AY609322.1      CTGCTTTTCCCACCAGGTATTCCAGGTGTGAGCCCGTTGATCCACTCAAATCCTGAAGAA 753
AY461925.1      CTGCTTTTCCCACCAGGTATTCCAGGTGTGAGCCCGCTGATCCACTCAAATCCTGAGGAA 751
***** ** *****

pVAX-LipL32c      TTGCAAAAACAAGCTATCGCTGCTGAAGAGTCTTTGAAAAAAGCTGCTTCTGACGCGACT 813
pVAX-LipL32      TTGCAAAAACAAGCTATCGCTGCTGAAGAGTCTTTGAAAAAAGCTGCTTCTGACGCGACT 840
AY609324.1      TTGCAAAAACAAGCTATCGCTGCTGAAGAGTCTTTGAAAAAAGCTGCTTCTGACGCGACT 813
GU183106.1      TTGCAAAAACAAGCTATCGCTGCTGAAGAGTCTTTGAAAAAAGCTGCTTCTGACGCGACT 813
AY609322.1      CTGCAAAAACAAGCTATCGCCCGGAAGAATCTTTGAAAAAAGCTGCTTCTGACGCGACT 813
AY461925.1      CTGCAAAAACAAGCTATCGCTGCTGAAGAGTCTTTGAAAAAAGCCGC----- 798
***** ** *****

pVAX-LipL32c      AAGTAA----- 819
pVAX-LipL32      AAGTAATCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGC 900
AY609324.1      AAGTAA----- 819
GU183106.1      AAGTATCTGTAA----- 825
AY609322.1      AAGTAA----- 819
AY461925.1      -----

```

Figura 15. Alineamiento de la secuencia del gen LipL32 expresado en células MARC 145 y distintas secuencias del género *Leptospira*.

Tabla 5. Matriz de porcentajes de identidad nucleotídica del gen LipL32 clonado en el vector pVAX-1.

Secuencia	pVAX-LipL32*	AY609324.1 ^a	GU183106.1 ^b	AY609322.1 ^c	AY461925.1 ^d
pVAX-LipL32 ^o	100%	99%	99%	95%	94%

*pVAX-LipL32: secuencia del gen LipL32 obtenida en este estudio a partir de *Leptospira interrogans* serovariedad *Icterohaemorrhagiae* cepa RGA

^opVAX-LpL32c: Secuencia del gen LipL32 expresado en células eucariotas

^aAY609324.1 : *Leptospira interrogans* serovariedad *autumnalis*

^bGU183106.1 : *Leptospira interrogans* serovariedad *icterohaemorrhagiae*

^cAY609322.1 : *Leptospira borgpetersenii* serovariedad *ballum*

^dAY461925.1 : *Leptospira santarosai* strain CZ299

T-160170

VII CONCLUSIONES

Se logró estandarizar una técnica de PCR capaz de detectar la presencia de *Leptospira* a partir de cultivos de referencia y de muestras serológicas de pacientes.

La PCR estandarizada mostró ser una buena técnica para el diagnóstico de leptospirosis, sobre todo en los primeros días de iniciados los síntomas de la enfermedad, comparada con la técnica de referencia (MAT).

Se obtuvo el plásmido pVAX-LipL32 utilizando material genético de *Leptospira interrogans*.

Se demostró la expresión del transcrito que codifica para la proteína LipL32, mediante la transfección del plásmido pVAX1-LipL32 en células de mamífero.

El rendimiento alcanzado para la producción de plásmido pVAX1-LipL32 a escala matraz es comparable al de otros sistemas reportados y es alentador para futuros trabajos.

VIII RECOMENDACIONES

Se recomienda implementar la técnica de PCR tiempo real para la detección de LipL32, para aumentar la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico. Con el fin de promover su uso como prueba de rutina para diagnóstico de leptospirosis, se recomienda realizar un estudio con más muestras para diagnóstico y contrastar los resultados con el MAT.

Para demostrar la expresión de la proteína LipL32 en células de mamífero, se recomienda realizar una prueba de ELISA o un Western Blot al lisado de células de la transfección, ya sea con anticuerpos de pacientes positivos o bien de animales inoculados. Sin embargo, primero se deberán producir anticuerpos (de reconocimiento de la proteína) monoclonales o policlonales que puedan ser utilizados como anticuerpos primarios en dichas técnicas de detección.

Un vez demostrado que la proteína es reconocida por los anticuerpos de pacientes o de animales, se recomienda escalar el proceso de producción del plásmido para realizar pruebas clínicas de la vacuna de ADNp.

IX LITERATURA CITADA

- Almond, J.W y I. Kusters. 2009. Vaccine Strategies. p. 235-243. En: B.W.J. Mahy y M.H.V. van Regenmortel, (eds.), Desk Encyclopedia of General Virology. Academic Press.
- Aviat, F., B. Blanchard., V. Michel., B. Blanchet., C. Branger., J. Hars., F. Mansotte., L. Brasme., C. De Champs., P. Bolut., P. Mondot., J. Faliu., S. Rochereau., A. Kodjo., G. Andre-Fontaine. 2009. Leptospira exposure in the human environment in France: A survey in feral rodents and in fresh water. *Comparative Immunology, Microbiology of Infectious Diseases*, 32: 463-476.
- Barrett, A.D.T. y L.R. Stanberry. 2009, Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases. Academic Press. p. 1291-1308.
- Bharti, A.R., J.E. Nally., J.N. Ricaldi., M.A. Matthias., M.M. Diaz., M.A. Lovett., P.N. Levett., R.H. Gilman., M.R. Willig., E. Gotuzzo., J.M. Vinetz. 2003, Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, 3: 757-771.
- Bhattacharya, S.K. and A.K. Dubey. 1997. Effects of dissolved oxygen and oxygen mass transfer on overexpression of target gene in recombinant E. coli. *Enzyme and Microbial Technology*, 20: 355-360.
- Branger C., B. Blanchard, C. Fillonneau, I. Suard, F. Aviat, B. Chevallier, G. Andre-Fontaine. 2005. Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. *FEMS Microbiology Letters*, 243: 437-445.
- Cachay E.R. and J.M. Vinetz. 2005. A global research agenda for leptospirosis. *Journal of Postgraduate Medicine*, 51: 171-174.
- Carnes A.E. 2005. Fermentation design for the manufacture of therapeutic plasmid DNA. *BioProcess International*, 3: 36-44.
- Céspedes, M. 2005. Leptospirosis: enfermedad zoonótica reemergente. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 22: 290-307.
- Céspedes, M., Tapia, R., Balda, L., Gonzalez, D., Peralta, C., Condori, P. 2007. Estandarización y validación de una prueba de PCR para el diagnóstico precoz de Leptospirosis humana. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 24: 20-26.
- 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: 4853-4863.
- Danquah, M.K., Forde, G.M. 2007. Growth medium selection and its economic impact on plasmid DNA production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104: 490-497.
- de Abreu Fonseca, C., Teixeira de Freitas, V.L., Caló Romero, E., Spinosa, C., Arroyo Sanches, M.C., Da Silva, M.V., Shikanai Yasuda, M.A. 2006. Polymerase chain reaction in comparison with serological tests for early diagnosis of human leptospirosis. *Tropical medicine & international health*, 11: 1699-1707.
- Ellinghausen, H.C., Jr., 1973, Growth temperatures, virulence, survival, and nutrition of leptospire. *Journal of medical microbiology*. 6: 487-497.
- Ellinghausen, H.C., Jr., 1975, Variable factors influencing the isolation of leptospire involving culture ingredients and testing. *Proceedings, annual meeting of the United States Animal Health Association*, 79: 126-141.

- Ferreira, G.N.M. 2005. Chromatographic approaches in the purification of plasmid DNA for therapy and vaccination. *Chemical Engineering & Technology*, 28:1285-1294.
- Ferreira, G.N.M., Monteiro, G.A., Prazeres, D.M.F., Cabral, J. 2000. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *Trends in Biotechnology*, 18:380-388.
- Flannery, B., Pereira, M.M. 2001. Referral pattern of leptospirosis cases during a large urban epidemic of dengue. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65: 657-663.
- Gale, E.F., Epps, H.M.R. 1942. The effect of the pH of the medium during growth on the enzymic activities of bacteria (*Escherichia coli* and *Micrococcus lysodeikticus*) and the biological significance of the changes produced. *Biochemical Journal*, 36: 600-618.
- Ganoza, C.A., Matthias, M.A., Collins-Richards D., Brouwer K.C., Cunningham C.B., Segura E.R., Gilman R.H., Gotuzzo E., Vinetz J.M. 2006. Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. *PLoS medicine*, 3:308.
- Garmory, H.S., Brown, K.A., Titball, R.W. 2003. DNA vaccines: improving expression of antigens. *Genetic Vaccines and Therapy*, 1:2.
- Garza-Velasco, R., Gallardo-Celis, J., Perea-Mejía, L.M. 2007. Fundamentos y avances de la vacunación con ADN. *Educación Química*, 18:181-187.
- Guerreiro, H., Croda, J., Flannery, B., Mazel, M., Matsunaga, J., Galvao Reis, M., 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*, 69:4958-4968.
- 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*, 68:2276-2285.
- Hartskeerl, R.A. 2006. Leptospirosis: Current status and future trends. *Indian journal of medical microbiology*, 24: 309.
- Hasan, U.A., M. Abai, A., Harper, D.R., Wren, B.W., Morrow, W.J.W. 1999. Nucleic acid immunization: concepts and techniques associated with third generation vaccines. *Journal of Immunological Methods*, 229: 1-22.
- Hill, R.J. 2006. Duration of immunity (DOI) and booster vaccination—dealing with the issue at practice level in the UK. *Veterinary microbiology*, 117: 93-97.
- Hopkins, D.J., Betenbaugh, M.J., Dhurjati, P. 1987. Effects of dissolved oxygen shock on the stability of recombinant *Escherichia coli* containing plasmid pKN401. *Biotechnology and Bioengineering*, 29:85-91.
- Levett, P.N. 2001. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14:296-326.
- Levett, P.N., Branch, S.L., Edwards, C.N. 2000. Detection of dengue infection in patients investigated for leptospirosis in Barbados. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 62: 112-114.
- Liu, M.A. 2003. DNA vaccines: a review. *Journal of internal medicine*, 253:402-410.
- Luchini, D., Meacci, F., Oggioni, M.R., Morabito, G., D'Amato, V., Gabbrielli, M., Pozzi, G. 2008. Molecular detection of *Leptospira interrogans* in human tissues and environmental samples in a lethal case of leptospirosis. *International Journal of Legal Medicine*, 122:229-233.

- Lloyd-Smith, J., Greig, D., Hietala, S., Ghneim, G., Palmer, L., St Leger, J., Grenfell, B., Gulland, F. 2007. Cyclical changes in seroprevalence of leptospirosis in California sea lions: endemic and epidemic disease in one host species? *BMC Infectious Diseases*, 7:125.
- Minke, J.M., Bey, R., Tronel, J.P., Latour, S., Colombet, G., Yvorel, J., Cariou, C., Guiot, A.L., Cozette, V., Guigal, P.M. 2009. Onset and duration of protective immunity against clinical disease and renal carriage in dogs provided by a bi-valent inactivated leptospirosis vaccine. *Veterinary microbiology*, 137:137-145.
- Montgomery, D.L., Prather, K.J. 2006. Design of plasmid DNA constructs for vaccines. *Methods in molecular medicine*, 127:11-22.
- Munford, R.S., 2008. Sensing Gram-Negative Bacterial Lipopolysaccharides: a Human Disease Determinant? *Infection and Immunity*, 76:454-465.
- Namdev, P.K., Irwin, N., Thompson, B.G., Gray, M.R. 1993. Effect of oxygen fluctuations on recombinant *Escherichia coli* fermentation. *Biotechnology and bioengineering*, 41:666-670.
- Nassi, F., Seixas, F.K., Jouglard, S.D.D., Simionatto, S., Silva, E.F., Seyffert, N., Brod, C.S., Dellagostin, O.A. 2003. Leptospirosis diagnosis using Nested-PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34:90-92.
- Navarrete-Espinosa, J., Acevedo-Vales, J.A., Huerta-Hernández, E., Torres-Barranca, J., Gavalda-Rosas, D.G. 2006. Prevalencia de anticuerpos contra dengue y leptospira en la población de Jaltipan, Veracruz. *Salud Pública de México*, 48:220-228.
- O'Kennedy, R.D., Baldwin, C., Keshavarz-Moore, E. 2000. Effects of growth medium selection on plasmid DNA production and initial processing steps. *Journal of Biotechnology*, 76:175-183.
- Ooteman, M.C., Vago, A.R., Koury, M.C. 2006. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *Journal of Microbiological Methods*, 65:247-257.
- Palatnik-de-Sousa, C.B. 2008. Vaccines for leishmaniasis in the for coming 25 years. *Vaccine*, 26:1709-24.
- Park, S.K., Lee, S.H., Rhee, Y.K., Kang, S.K., Kim, K.J., Kim, M.C., Kim, K.W., Chang, W.H. 1989. Leptospirosis in Chonbuk Province of Korea in 1987: a study of 93 patients. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 41:345-351
- Plank, R., Dean, D. 2000. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes and Infection*, 2:1265-1276.
- Prather, K.J., Sagar, S., Murphy, J., Chartrain, M. 2003. Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification. *Enzyme and Microbial Technology*, 33:865-883.
- Prazeres, D.M.F., Monteiro, G.A., Ferreira, G.N.M., Diogo, M.M., Ribeiro, S.C., Cabral, J.M.S. 2001. Purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Biotechnology Annual Review*, 7:1-30.
- Ratledge, C., Kristiansen, B. 2006. *Basic biotechnology*. Cambridge University Press. UK. 666 p.
- Reis, R.B., Ribeiro, G.S., Felzemburgh, R.D.M., Santana, F.S., Mohr, S., Melendez, A., Queiroz, A., Santos, A.C., Ravines, R.R., Tassinari, W.S. 2008. Impact of Environment and Social Gradient on *Leptospira* Infection in Urban Slums. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2:e228.

- Reitstetter, R.E. 2006. Development of species specific PCR primer sets for the detection of *Leptospira*. *FEMS microbiology letters*, 264:31-39.
- Smooker, P.M., Rainczuk, A., Kennedy, N., Spithill, T.W. 2004. DNA vaccines and their application against parasites--promise, limitations and potential solutions. *Biotechnology Annual Review*, 10:189-236.
- Smythe, L.D. 1999. Leptospirosis worldwide. *Weekly epidemiological record*, 74:237-242.
- Tejeda-Mansir, A., Montesinos, R.M. 2008. Upstream Processing of plasmid DNA for vaccine and gene therapy applications. *Recent Patents on Biotechnology*, 2:156-172.
- Terpstra, W.J. 2003. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. World Health Organization, International Leptospirosis Society.
- Vijayachari, P., Sugunan, A.P., Shriram, A.N. 2008. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *Journal of biosciences*, 33:557-569.
- Vivian, J.P., Beddoe, T., McAlister, A.D., Wilce, M.C., Zaker-Tabrizi, L., Troy, S., Byres, E., Hoke, D.E., Cullen, P.A., Lo, M., Murray, G.L., Adler, B., Rossjohn, J. 2009. Crystal structure of LipL32, the most abundant surface protein of pathogenic *Leptospira* spp. *Journal of molecular biology*, 387:1229-1238.
- Wang, Z., Jin, L., Wegrzyn, A. 2007. Leptospirosis vaccines. *Microbial Cell Factories*, 6:39.
- Wang, Z., Le, G., Shi, Y., Wegrzyn, G. 2001. Medium design for plasmid DNA production based on stoichiometric model. *Process Biochemistry*, 36:1085-1093.
- Xu, Z., Shen, W., Chen, H., Cen, P. 2005. Effects of medium composition on the production of plasmid DNA vector potentially for human gene therapy. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 6:396-400.
- Xue, F., Yan, J., Picardeau, M. 2009. Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned from the genomes. *Microbes and infection*, 11:328-333.
- Zheng, S., Friehs, K., He, N., Deng, X., Li, Q., He, Z., Xu, C., Lu, Y. 2007. Optimization of medium components for plasmid production by recombinant *E. coli* DH5 pUK21CMV 1. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12:213-221.