

Aspectos moleculares relevantes de las proteínas de patogenicidad de *Leptospira* sp.

Mónica Baquero Parra* / Arlen Patricia Gómez**
Patricia Hernández Rodríguez***

RESUMEN

La leptospirosis es una zoonosis ampliamente difundida, que afecta cerca de 160 especies salvajes y domésticas, las cuales se constituyen en reservorios latentes y son fuente primaria de contaminación para el hombre. Esta zoonosis es causada por la *Leptospira* sp., bacteria Gram negativa que tiene la capacidad de sobrevivir en la orina. Esto, sumado a la presencia de charcos, lagunas y aguas estancadas que se contaminan fácilmente y se convierten en un foco permanente de transmisión, hace de la leptospirosis una enfermedad de impacto en salud pública. La leptospirosis se diagnostica utilizando la técnica convencional por microglutinación (MAT). Sin embargo, no existen criterios unificados respecto a los títulos

considerados como positivos, originando un número relevante de falsos positivos y negativos. Por consiguiente, es necesario evaluar nuevas estrategias diagnósticas altamente sensibles y específicas para lograr un diagnóstico preciso y confiable. Con este artículo se busca hacer una revisión sobre el papel de las proteínas asociadas con patogenicidad y la utilidad de estudios de expresión génica, en la implementación de nuevas técnicas diagnósticas que permitan postular marcadores moleculares de infección.

Palabras clave: leptospirosis, proteínas de patogenicidad, marcadores moleculares, expresión génica.

* Médica Veterinaria, Universidad de La Salle, M.Sc.(C) en Ciencias Veterinarias, Universidad de La Salle. Correo electrónico: mbaquero04@unisalle.edu.co

** Médica Veterinaria, Universidad Nacional de Colombia, Ph.D. en Salud Animal, Universidad Nacional de Colombia-Universidad de Santiago de Compostela. Profesora Asociada de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de La Salle. Correo electrónico: agomez@unisalle.edu.co

***L. Biología, Universidad Distrital, Especialista en Epidemiología, Universidad del Rosario. M.Sc en Biología, énfasis Genética Molecular, Pontificia Universidad Javeriana. Directora Grupo de Investigación Biología Molecular e Inmunogenética (BIOMIGEN). Docente Investigador, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de la Salle. Correo electrónico: phernandez@unisalle.edu.co

Fecha de recepción: noviembre 26 de 2009.

Fecha de aprobación: febrero 26 de 2010 .

RELEVANT MOLECULAR ASPECTS OF LEPTOSPIRAL PATHOGENICITY PROTEINS

ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonosis disseminated around the world, affecting about 160 wild and domestic species, which are latent reservoirs and a main source of contamination for humans. This zoonosis is caused by *Leptospira sp.*, Gram-negative bacteria have the ability to survive in the urine. In addition, the impact in Public Health is given for the presence of puddles, ponds and standing water that are easily contaminated and that is become a permanent focus of transmission. Leptospirosis is diagnosed by using the conventional technique microglutinación

(MAT). However, there are no standardized criteria of titles considered positive, resulting in a significant number of positives and negatives false. Therefore, it is necessary to evaluate new diagnostic strategies highly sensitive and specific to achieve a reliable and accurate diagnosis. This article seeks to review the role of proteins associated with pathogenicity and utility of gene expression studies in the implementation of new diagnostic techniques that allow postulating molecular markers of infection.

Keywords: leptospirosis, pathogenicity proteins, molecular markers, gene expression.

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una infección zoonótica ampliamente distribuida alrededor del mundo, siendo más frecuente en zonas tropicales. La mayoría de las infecciones por *Leptospira* en bovinos de las áreas tropicales y subtropicales son causadas por *Leptospira interrogans* serovariante Hardjo (Srivastava *et ál.*, 2006; Escamilla *et ál.*, 2007; Hernández *et ál.*, 2008).

La leptospirosis es producida por una espiroqueta del género *Leptospira*. Esta bacteria tiene forma de espiral y es flexible. Se clasifica como Gram negativa y posee un flagelo interno. Los sistemas de clasificación tradicional, basados en especificidad bioquímica y serológica, han diferenciado especies patógenas (*Leptospira interrogans*) y especies saprofitas (*Leptospira biflexa*). Adicionalmente, las especies se subdividen en más de doscientos serovares para *Leptospira interrogans* y más de sesenta serovares para *Leptospira biflexa*, según las proteínas que expresan (Bharti, 2003).

En los bovinos la infección con *Leptospiras* se establece a través de las membranas mucosas nasales, orales y de la conjuntiva o abrasiones de la piel. La incubación es de tres a doce días, posteriormente sigue una fase leptospirémica, donde las *Leptospiras* invaden órganos internos como el hígado, el riñón, los órganos reproductivos, las membranas fetales, el feto y la glándula mamaria en las vacas y los testículos, el epidídimo y las vesículas seminales en los toros, donde ocasionan un daño tisular severo. La severidad del cuadro clínico depende de las características de la serovariante involucrada. Con la aparición de los anticuerpos en el suero, la leptospiremia se reduce y las *Leptospiras* son eliminadas por fagocitosis en los órganos internos, a excepción del riñón donde sobreviven (Orrego *et ál.*, 2003; Alfaro *et ál.*, 2004; Hernández *et ál.*, 2003; Victoria *et ál.*, 2002; Kanchan *et ál.*, 2008).

Las investigaciones conducentes al desarrollo de vacunas han clasificado éstas como recombinantes de proteínas, lipopolisacáridos, de DNA, inactivas y atenuadas (Wang *et ál.*, 2007). El objetivo de este artículo es describir las características bioquímicas y moleculares de las proteínas de patogenicidad candidatas para la elaboración de inmunógenos para la prevención de la leptospirosis; así como, la utilidad que puedan presentar como marcadores moleculares de patogenicidad.

PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA (OMP)

La identificación de proteínas antigénicas expresadas durante la infección tiene una implicación importante para el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico serológico y para la producción de vacunas. La mayoría de las investigaciones relacionadas con los antígenos de *Leptospira*, se basan en los lipopolisacáridos, debido a que las variaciones en las cadenas laterales de carbohidratos son las responsables de la diversidad antigénica observada entre las diferentes cepas de *Leptospira* (Faine *et ál.*, 1999).

Las espiroquetas, incluyendo las bacterias del género *Leptospira*, poseen una membrana citoplasmática y una membrana externa (Holt, 1978). A pesar de que la identificación y la caracterización de los componentes de la membrana externa de las especies de *Leptospira* es compleja, diversas técnicas han logrado determinar tres tipos de proteínas de la membrana externa (OMP, por sus siglas en inglés Outer Membrane Proteins): transmembranales, lipoproteínas y proteínas periféricas de la membrana (Haake y Matsunaga, 2002).

Las OMP desempeñan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad, debido a que actúan como adhesinas (Bessen y Gotschlich, 1986; Isberg y Falkow, 1985; Miller y Falkow, 1988; Sansonetti, 1991), puntos de fijación de los anticuerpos (Murphy

y Bartos, 1988; Saukkonen *et ál.*, 1987), porinas (Jeanteur *et ál.*, 1991; Li *et ál.*, 1991; McGuinness *et ál.*, 1990), receptores para proteínas solubles como los sideróforos (Stoebner y Payne, 1988) y proteínas del complemento (Hoffman *et ál.*, 1992).

Las OMP's revisten gran importancia en investigación debido a que, por su localización estratégica, son responsables de la interacción de los patógenos con el hospedador (Sansone, 1991). Incluso se presume que las OMP's participan en los mecanismos de evasión de la respuesta inmune y, por ende, de la persistencia de las espiroquetas en el hospedador (Blanco, 1990).

Entre las proteínas aisladas de *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni se encuentran: LipL32, LipL21, LipL45, LipL31, OmpL1, Flagelina/FlaB1, LipL36, LipL41, LipL71 y LigA (Nally, 2007). Dentro de éstas, las proteínas LipL31 y OmpL1 son candidatas para la producción de inmunógenos.

OMP1 Y LIPL32

La primera proteína transmembranal descrita en especies patógenas de *Leptospira sp.* fue la OmpL1 (Haake *et ál.*, 1993). Su estructura contiene por lo menos diez segmentos transmembranales β y canales de porinas en la bicapa lipídica (Shang, 1995). Los segmentos transmembranales β son anfipáticos, lo que indica que los residuos hidrofóbicos orientados hacia la membrana, se alternan con otros residuos hidrofílicos orientados hacia el interior de la proteína (Haake, 1993). Las porinas, como la OmpL1, permiten la difusión de solutos hidrofílicos a través de la membrana externa hacia el periplasma (Haake y Matsunaga, 2002).

De acuerdo con la secuencia de aminoácidos de la OmpL1, se ha determinado que no es una lipoproteína; por otra parte, las lipoproteínas poseen sitios de unión de peptidasa II, mientras que la OmpL1 tiene

sitios de unión para peptidasa I, los cuales se confirman por la presencia de una secuencia de aminoácidos N-terminal (leucina-serina-alanina) (Haake, 1993).

La expresión de la proteína OmpL1 es controlada por genes diferentes (*ompL1/1*, *ompL1/2* y *ompL1/3*). Sin embargo, se considera que las diferencias entre los genes *ompL1*, no afectan la inmunogenicidad de la proteína. Adicionalmente, como se mencionó en los párrafos anteriores, la OmpL1 se postula un antígeno específico para el desarrollo de vacunas y diagnóstico serológico de leptospirosis, debido a que se encuentra en todas las cepas patógenas de *Leptospira*, y está ausente en las cepas saprofitas (Dong *et ál.*, 2008). La estructura del gen *ompL1* consta de 960 bases que codifican una proteína compuesta por 320 aminoácidos (Haake, 1993).

La proteína LipL32 también es importante en la patogénesis de la enfermedad, debido a que se encuentra de forma abundante en la superficie de la membrana externa de las especies de *Leptospira*, siendo evidente su alta capacidad inmunogénica (Zuerner *et ál.*, 1991). Asimismo, se encuentra en la membrana citoplasmática de la bacteria (Haake y Matsunaga 2002), anclada a la membrana externa a través de una modificación covalente de residuos de cisteína amino-terminal por ácidos grasos en el átomo de nitrógeno y un diacilglicerol en la cadena de sulfuro lateral (Haake *et ál.*, 2000). Al igual que la proteína transmembranal OmpL1, la LipL32 es considerada como un blanco para el desarrollo de vacunas y nuevos métodos diagnósticos para leptospirosis (Guerreiro *et ál.*, 2001; Zhang *et ál.*, 2005), siendo considerada como un antígeno inmunodominante. Los hallazgos recientes demuestran que la LipL32 es el antígeno dominante durante la respuesta inmune humoral a leptospirosis en humanos, mostrando la mayor sensibilidad y especificidad en pacientes con la enfermedad, ya sea en fase aguda o convalecientes (Flanery *et ál.*, 2001; Guerreiro *et ál.*, 2001).

La lipoproteína LipL32 tiene una masa molecular de aproximadamente 26,7 kDa y su movilidad electroforética es de 32 kDa (Haake, 2000). Se considera que promueve la hemólisis mediada por esfingomielinasa SphH, por esta razón, esta lipoproteína también se conoce como Hap-1 (Proteína asociada con hemólisis) (Lee, 2000).

La expresión del RNAm del gen que codifica para la proteína LipL32 fue detectada en seis cepas de *Leptospira*, incluyendo cinco cepas de *Leptospira interrogans* y una de *Leptospira borgpetersenii*, lo cual indica que la LipL32 recombinante es un candidato óptimo como antígeno molecular para el diagnóstico sérico (Zhang *et ál.*, 2005; Flannery *et ál.*, 2001).

En el estudio realizado por Haake *et ál.*, (1991) se demostró que la expresión de LipL32 es constante en las diferentes cepas de *Leptospira interrogans*, excepto en los serovares Bakeri y Fort Bragg, que presentaron niveles de expresión ligeramente menores.

A través de la técnica de fraccionamiento de membrana de plasmólisis alcalina, se determinó que tanto la LipL32 como la LipL41 tienen aminoácidos neutrales en las posiciones +2 y +3, lo que confirma la presencia de estas lipoproteínas en la membrana citoplasmática y en la membrana externa (Yamaguchi *et ál.*, 1988).

Investigaciones realizadas con inmunoblot indican que los dominios C-terminal e intermedios de LipL32 son reconocidos en el suero, generando IgM específicas para la porción C-terminal tanto en pacientes en fase aguda como convaleciente (Hauk *et ál.*, 2008).

Aunque los estudios de mutagénesis de transposones de LipL32 en *Leptospira interrogans* en los modelos animales de infección aguda o crónica, indican que el papel que desempeña esta proteína no es esencial en la patogénesis (Murray, 2008), no existen hallazgos

que permitan descartar su función en la interacción entre la bacteria y el hospedero (Hauk *et ál.*, 2009).

El gen que codifica la lipoproteína *lipL32* está presente únicamente en las especies de *Leptospira* patógenas con un alto grado de conservación (Haake, 2004), siendo uno de los blancos principales de la respuesta inmune (Haake *et ál.*, 2000).

Se considera que la LipL32 está involucrada en la patogénesis de la leptospirosis a través de la matriz extracelular, posiblemente debido a que los elementos presentes en la porción C-terminal con proteínas ortólogas de LipL32 funcionan como dominios de unión de la matriz extracelular en diferentes bacterias (Hauk, 2008).

En el estudio realizado por Zhang (2005) se demostró que las proteínas recombinantes de LipL32 y OmpL1 tienen un grado alto de reactividad con suero de pacientes infectados con *Leptospira interrogans* serovar Lai y otras *Leptospiras* patógenas. Los resultados de este estudio indican que estas proteínas serían candidatos para el desarrollo de vacunas contra la leptospirosis.

LipL36

Es una lipoproteína de la membrana externa de 36 kDa. Se considera que su componente lipídico está modificado en el residuo cisteína amino terminal. Como las demás lipoproteínas de espiroquetas, la LipL36 se fracciona selectivamente con Triton X-114 hidrofóbico en la fase detergente. El procesamiento de la LipL32 es detenido por globomicina, un inhibidor selectivo de la señal peptidasa de la lipoproteína (Haake *et ál.*, 1998). Casi el 16% de los residuos de la proteína madura son compuestos por alanina y los arreglos de la misma se presentan en su mayoría en pares o tripletas. Se presume que cerca del 38% de las secuencias de LipL36 en las regiones alfa-helicoidales son alaninas (Haake *et ál.*, 1998).

La gran adaptabilidad a diferentes ambientes es una de las características de la *Leptospira*; sin embargo, las reacciones moleculares que se presentan para que esto sea posible aún no han sido identificadas. Se considera que la LipL36 es una proteína de expresión que se regula de acuerdo a las condiciones ambientales. En estudios inmunohistoquímicos se demostró la expresión de la LipL36 en cultivos *in vitro* a 30° C, pero no se detectó la infección de tejidos ni cultivos a una temperatura de 37° C. Esto indica una respuesta adaptativa del organismo a la infección, induciendo la disminución en la expresión de LipL36 (Nally, 2001).

Adicionalmente, en diversos estudios en cultivos bacterianos *in vitro* se han evidenciado diferencias en la expresión de LipL36. Se considera que existe gran cantidad de LipL36 en cultivos de *Leptospira kirschneri* durante su crecimiento logarítmico temprano; sin embargo, hacia la fase media del crecimiento, la presentación de la lipoproteína se ve disminuida. Se han realizado dos interpretaciones con relación a esto: posiblemente la expresión de la LipL36 es regulada para que hacia el final de la fase de crecimiento logarítmico no se exprese; por otra parte, se considera que la LipL36 es blanco para algunas proteasas endógenas y su digestión se hace más evidente hacia la fase tardía del crecimiento logarítmico. Sin embargo, debido a la conservación de la integridad de la LipL36 durante los experimentos, aún existen dudas sobre la hipótesis de digestión enzimática (Haake *et ál.*, 1998).

Los hallazgos de la LipL36 sugieren que esta lipoproteína es una herramienta de gran utilidad para el estudio de la adaptabilidad de las especies patógenas de *Leptospira* (Haake *et ál.*, 1998).

LipL41

Es una lipoproteína que se expresa en la superficie de las membranas interna y externa de las especies de *Leptospira*, y actúa de forma sinérgica con OmpL1

(Haake *et ál.*, 1999; Shang *et ál.*, 1996). La LipL41 es una lipoproteína de 41 kDa hidrofóbica. La clonación molecular y la secuencia del gen *lipL41*, reveló un sitio de clivaje peptidasa de señal de lipoproteína con Leu-X-Y-Cys. Además, se determinó que la LipL41 es inhibida por la globomicina (Shang *et ál.*, 1996).

El estudio de Nally *et ál.*, (2007) evidenció que LipL41, LigA y LipL21 se encuentran en cantidades reducidas en los tejidos infectados con *Leptospira* al comparar la cantidad en cultivos *in vitro*.

En contraste con otros lipopolisacáridos, LipL41 y OmpL1, se encuentran antigénicamente conservados entre las especies de *Leptospira* (Shang, 1996). Se considera que LipL41 junto con OmpL1 son excelentes candidatos para el desarrollo de vacunas, debido a su presencia durante la infección de mamíferos (Barnett *et ál.*, 1999). En un estudio de animales inmunizados con OmpL1 y LipL41 recombinantes en la membrana externa de *Escherichia coli* se determinó una tasa de supervivencia de 71%, comparado con 25% del grupo control. Además, se demostró que OmpL1 y LipL41 no ejercen protección cuando se encuentran independientes (Haake, 1999).

En un estudio en el que se evaluó el tejido renal de hámsters infectados con *Leptospira kirschneri* se reveló la presencia de LipL41 en el lumen del túbulo renal, mientras que en el intersticio únicamente se identificaron lipopolisacáridos y OmpL1. Esto se debe posiblemente a que la migración de antígenos desde la membrana externa es selectiva o a que LipL41 es fácilmente degradada por las enzimas proteolíticas halladas en el citoplasma de las células o en el intersticio del riñón (Barnett *et ál.*, 1999).

Debido a la dificultad para la producción de lipoproteínas en sistemas de expresión heterólogos, solamente se ha reportado a LipL41 como posible candidato potencial para la elaboración de biológicos. Sin embargo, algunos autores mencionan que LipL32,

LipL45 y LipL21 también podrían ser utilizados para el desarrollo de vacunas (Wang *et ál.*, 2007), debido a la conservación de la secuencia en las especies de *Leptospira* (Haake, 2004).

LipL21

Después de LipL32, LipL21 es la lipoproteína más abundante en la membrana externa de *Leptospira interrogans* serovar Lai (Cullen *et ál.*, 2002). Por otra parte, estudios realizados por el mismo autor determinaron que después de inocular hámsters con LipL21 recombinante, se identificaron anticuerpos producidos específicamente contra la proteína (Cullen *et ál.*, 2003).

Se considera que LipL21 es una excelente opción para el desarrollo de vacunas, debido a que experimentos en que se ha clonado el gen *lipL21* para insertarlo en vectores de expresión eucarióticos para inmunizar cobayos, demuestran una buena respuesta antigénica (He *et ál.*, 2008).

Al igual que otras lipoproteínas descritas, LipL21 sólo se expresa en cepas patógenas de *Leptospira*, y no en cepas saprofitas (Cullen *et ál.*, 2003; He *et ál.*, 2008).

PROTEÍNAS LEPTOSPIRALES SIMILARES A LAS INMUNOGLOBULINAS (Lig)

A este grupo de proteínas pertenecen LigA, LigB y LigC, las cuales tienen 12, 13 y 12 dominios, respectivamente. Estas son similares a proteínas de adhesión como la intimina de *E. coli* y *Yersinia pseudotuberculosis*. La expresión de LigA y LigB está controlada por las señales ambientales y la osmolaridad para alcanzar la unión de la *Leptospira* a las células del hospedador. Los hallazgos indican que estas proteínas son factores de virulencia en especies patógenas de *Leptospira* (Lin y Chang, 2007).

LigA es una proteína de 130 kDa, denominada proteína similar a inmunoglobulina de *Leptospira*. También se considera como blanco para la producción de vacunas. Esta proteína altamente inmunogénica se expresa en la infección por *Leptospira* en equinos (Palaniappan, 2002).

LigA es básicamente hidrofílica, con algunas regiones hidrofóbicas ubicadas en los residuos 4 a 24, 306 a 326, 402 a 422, 490 a 510 y 1034 a 1054. Consiste en regiones β con algunas regiones α -helicoidal. Se han detectado doce o más repeticiones en tándem de noventa aminoácidos. De acuerdo con algunas características de LigA, se presume que puede actuar como una molécula de adhesión y sólo se expresa *in vivo*. Además se propone a LigA como base para el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico para identificar animales vacunados y animales infectados (Palaniappan, 2002).

La amplificación del gen *ligA* por medio de PCR, a partir de ADN de serovares patógenos como hardjo, icterohaemorrhagiae, grippotyphosa, y canicola, demostró que una secuencia similar se encuentra distribuida en varios serovares de *Leptospira interrogans*. Sin embargo, otros estudios han demostrado que las secuencias de *ligA* en los serovares pomona y grippotyphosa tienen mayor semejanza que las encontradas en canicola e icterohaemorrhagiae (Palaniappan *et ál.*, 2002).

Los genes *ligA*, *ligB* y *ligC* codifican determinantes de virulencia en cepas patógenas (Matsunaga *et ál.*, 2003). Las proteínas Lig han sido utilizadas como marcadores para el diagnóstico temprano de la enfermedad y como candidatos para vacunas (Yan *et ál.*, 2009). Los genes que codifican estas proteínas son altamente conservados (70 – 99%) en cepas patógenas de *Leptospira* (McBride *et ál.*, 2009). El gen *ligB* está presente en todos los aislamientos de cepas de *Leptospira*, mientras que *ligA* únicamente se encuentra en *Leptospira interrogans* y *Leptospira kirschneri* (Cerqueira *et ál.*, 2009).

PROTEÍNAS *HEAT SHOCK*

GroEL es una proteína inmunoreactiva dominante, que se encuentra en la fracción soluble de la célula. Esta proteína ha sido reportada en especies patógenas y saprofitas de *Leptospira* (Guerreiro *et ál.*, 2001).

Se han identificado dos antígenos, p62 y p76, que actúan en sinergismo con GroEL y DnaK respectivamente. La expresión de las proteínas *heat shock*, GroEL y DnaK, se regula a temperaturas elevadas en los hospederos mamíferos (Stamm *et ál.*, 1991; Guerreiro *et ál.*, 2001). GroEL y DnaK se reconocen en el suero de pacientes en la fase aguda y convaleciente de la enfermedad. De hecho, en el suero de pacientes en fase aguda sometido a inmunoblot, GroEL se encuentra en mayor proporción (45%) que LipL32 (37%). Sin embargo, sólo el 16% de los casos confirmados demostró seroconversión de GroEL entre pacientes en fase aguda a fase de convalecencia, en contraste con 50% de LipL32. Lo anterior sugiere que la inmunorreactividad observada en la fase aguda se debe a anticuerpos preexistentes o a una respuesta exacerbada (Guerreiro *et ál.*, 2001). Se ha reportado que la mayor parte de la respuesta inmune a enfermedades infecciosas corresponde a proteínas de tipo *heat shock* (Stamm *et ál.*, 1991).

BIBLIOGRAFÍA

- Alfaro, C; Aranguren, Y. y Clavijo, A. "Prevalencia serológica de leptospirosis en ganado doble propósito del noreste de Monagas, Venezuela". *Zootecnia Trop.* 22. 2. (2004):117-132.
- Barnet, J.; *et ál.* "Expression and Distribution of Leptospiral Outer Membrane Components during Renal Infection of Hamsters". *Infect. Immun.* 67. 2. (1999):853-861.
- Bessen, D. y Gotschlich, E. "Interactions of gonococci with HeLa cells: attachment, detachment, replication, penetration, and the role of protein II". *Infect. Immun.* 54. 1. (1986):154-160.
- Blanco, D.; *et ál.* "A complement activation limits the rate of in vitro treponemicidal activity and correlates with antibody-mediated aggregation of *Treponema pallidum* rare outer membrane protein "TROMP"" *J. Immunol.* 144. 5. (1990): 1914-1921.

El determinante antigénico dominante de GroEL es una región de veinte aminoácidos (Park *et ál.*, 1999). La proteína GroEL puede tener reactividad cruzada con proteínas de otras bacterias, lo que limita la posibilidad de utilizarla como marcador específico de serorreactividad a especies de *Leptospira* (Guerreiro *et ál.*, 2001).

CONCLUSIONES

La leptospirosis es una infección zoonótica ampliamente distribuida en el mundo. Debido a su alta prevalencia e incidencia en zonas tropicales, es indispensable aumentar el número de estudios e investigaciones en el país, para conocer la fisiopatología de la enfermedad y así plantear estrategias de control y prevención eficientes en especies altamente susceptibles como bovinos, caninos e incluso humanos. Debido al escaso conocimiento en su dinámica de crecimiento y a la expresión y comportamiento de las OMP's, es necesario plantear investigaciones en la búsqueda de nuevos candidatos para el desarrollo de pruebas diagnósticas y de vacunas, con el fin de garantizar un control eficiente de la enfermedad en el país.

- Bharti, A.; *et ál.* "Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet*". *Infect. Dis.* 3. (1990): 757–771.
- Cerqueria, G; *et ál.* "Distribution of the leptospiral immunoglobulin-like (lig) genes in pathogenic *Leptospira* species and application of ligB to typing leptospiral isolates". *J. Med. Microbiol.* 58. (2009): 1173–1181.
- Cullen, P; *et ál.* "Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar". *Infect. Immun.* 70. 5. (2002): 2311–2318.
- Cullen, P; *et ál.* "LipL21 Is a Novel Surface-Exposed Lipoprotein of Pathogenic *Leptospira* Species". *Infect. Immun.* 71.5. (2003): 2414–2421.
- Dong, H; *et ál.* "Characterization of the ompL1 gene of pathogenic *Leptospira* species". *BMC Microbiol.* 8 (2008): 223.
- Escamilla, H; *et ál.* "Frequency and causes of infectious abortion in a dairy herd in Mexico". *Can. J. Vet. Res.* 71. (2007): 314–317.
- Faine, S; *et ál.* *Leptospira and Leptospirosis*. (2 ed.). Melbourne, Australia: MediSci, 1999.
- Flannery, B; *et ál.* "Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis". *J. Clin. Microbiol.* 39. 9. (2001): 3303–3310.
- Guerreiro, H; *et ál.* "Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans". *Infect. Immun.* 69. 8. (2001): 4958–4968.
- Haake, D; *et ál.* "Changes in the Surface of *Leptospira interrogans* Serovar grippityphosa during In Vitro Cultivation". *Infect. Immun.* 59. 3. (1991): 1131–1140.
- Haake, D; *et ál.* "Molecular Cloning and Sequence Analysis of the Gene Encoding OmpL1, a Transmembrane Outer Membrane Protein of Pathogenic *Leptospira spp*". *J. Bacteriol.* 175. 13. (1993): 4225–4234.
- Haake, D; *et ál.* "Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection". *Infect. Immun.* 66. 4. (1998):1579–1587.
- Haake, D; *et ál.* "The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection". *Infect. Immun.* 68.4. (2000): 2276–2285.
- Haake, D. y Matsunaga, J. "Characterization of the Leptospiral Outer Membrane and Description of Three Novel Leptospiral Membrane Proteins". *Infect. Immun.* 70. 9. (2002): 4936–4945.
- Haake, D; *et ál.* "Molecular Evolution and Mosaicism of Leptospiral Outer Membrane Proteins Involves Horizontal DNA Transfer". *J. Bacteriol.* 186. 9. (2004): 2818–2828.
- Hauk, P; *et ál.* "LipL32, the major leptospiral lipoprotein: the Cterminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin". *Infect. Immun.* 76. 6. (2002): 2642–2650.
- Hauk, P; *et ál.* "Structure and Calcium-Binding Activity of LipL32, the Major Surface Antigen of Pathogenic *Leptospira sp.*". *J. Mol. Biol.* 390. 4. (2009): 722–736.
- He, H; *et ál.* "Protection of Guinea Pigs against *Leptospira interrogans* Serovar Lai by LipL21 DNA Vaccine". *Cell. Mol. Immunol.* 5. 5. (2008): 385–391
- Hernández, P; *et ál.* "Comparación del cultivo microbiológico y visualización por campo oscuro para el diagnóstico de leptospirosis en bovinos de la Sabana de Bogotá". *Revista de Investigación Universidad de La Salle* 8. 1. (2008): 9–15.

- Hernández, P. y Rodríguez, M. "Microorganismos transmitidos por animales al hombre y sus implicaciones sistémicas y oculares". *Revista científica de la salud visual "Franja Visual"* 13.68. (2003): 6–11.
- Hoffman, P.; Ripley, M. y Weeratna, R. "Cloning and nucleotide sequence of a gene (ompS) encoding the major outer membrane protein of *Legionella pneumophila*". *J. Bacteriol.* 174. (1992): 914–920.
- Holt, S. "Anatomy and chemistry of spirochetes". *Microbiology* 42. (1978):114–160.
- Isberg, R. y Falkow, S. "A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12". *Nature.* 317. 6034. (1985): 262–264.
- Jeanteur, D; Lekey, J. y Patus, F. "The bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction". *Mol. Microbiol.* 5. 9. (1991): 2153–2164.
- Kanchan, K. y Kalawat, U. "Early diagnosis of leptospirosis by conventional methods: One-year prospective study". *Indian J. Pathol. Microbiol.* 51. 2. (2008): 209–211.
- Lee, S; *et ál.* "Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Lai". *Gene.* 254. 1-2. (2000):19–28.
- Li, Z; *et ál.* "Cloning and sequencing of the structural gene for the porin protein of *Bordetella pertussis*". *Mol. Microbiol.* 5. 7. (1991):1649–1656.
- Lin, Y. y Chang, Y. "A domain of the *Leptospira* LigB contributes to high affinity binding of fibronectin". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362. 2. (2007): 443–448.
- Matsunaga, J.; *et ál.* "Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily". *Mol. Microbiol.* 49. 4. (2003): 929–945.
- McBride, A; *et ál.* "Genetic diversity of the leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira spp*". *Infect. Genetics and Evolution* 9. 2. (2009): 196–205.
- McGuinness, B; *et ál.* "Comparative sequence analysis of the class 1 protein gene (porA) from three strains of *Neisseria meningitidis*: synthetic peptides define the epitopes responsible for serosubtype specificity". *J. Exp. Med.* 171. (1990): 1871–1882.
- Miller, V. y Falkow, S. "Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells". *Infect. Immun.* 56. 5. (1988): 1242–1248.
- Murphy, T. y Bartos L. "Human bactericidal antibody response to outer membrane protein P2 of nontypeable *Haemophilus influenzae*". *Infect. Immun.*, 56. 10. (1988): 2673–2679.
- Murray, G; *et ál.* "The major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*". *Infect. Immun.* 77. 3. (2008): 952–958.
- Nally, J.; Timoney, J. y Stevenson B. "Temperature-regulated protein synthesis by *Leptospira interrogans*". *Infect Immun.* 69. 1.(2001): 400–404.
- Nally, J; *et ál.* "Characterization of the Outer Membrane Proteome of *Leptospira interrogans* Expressed during Acute Lethal Infection". *Infect. Immun.* 75. 2. (2007):766–773.
- Orrego, A; Giraldo de León, G. y Valencia, P. "Leptospirosis en personas de riesgo de quince explotaciones porcinas y de la central de sacrificio de Manizales, Colombia". *Arc. Med. Vet.*, 35. (2003):1–10.
- Palaniappan, R; *et ál.* "Cloning and Molecular Characterization of an Immunogenic LigA Protein of *Leptospira interrogans*". *Infect. Immun.* 70. 11.(2002): 5924–5930.

- Park, S.; Ahn, B. y Kim, N. "Expression and immunologic characterization of recombinant heat shock protein 58 of *Leptospira* species: a major target antigen of the humoral immune response". *DNA Cell. Biol.* 18. 12. (1999): 903–910.
- Sansonetti, P. J. "Genetic and molecular basis of epithelial cell invasion by *Shigella* species". *Rev. Infect. Dis.*, 13. Supl.4. (1991): 285–292.
- Saukkonen, K; *et ál.* "Protective efficacy of monoclonal antibodies to class 1 and class 3 outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* B:15:P1.16 in infant rat infection model: new prospects for vaccine development". *Microb. Pathog.* 3. 4. (1987): 261–267.
- Shang, E; *et ál.* "The Rare Outer Membrane Protein, OmpL1, of Pathogenic *Leptospira* Species Is a Heat-Modifiable Porin". *Infect. Immun.* 63. 8. (1995): 3174–3181.
- Shang, E.; Summers, T. y Haake, D. "Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species". *Infect. Immun.* 64. 6. (1996): 2322–2330.
- Srivastava, S. "Prospects of developing a leptospiral vaccine for animals. Indian". *J. Med. Microbiol.* 24.4. (2006):331–336.
- Stam, L.; Gherardini, F.; Parrish, E. y Moomaw, C. "Heat shock response of spirochetes". *Infect. Immun.* 59. 4. (1991):1572–1575
- Stoebner, J. y Payne, S. "Iron-regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholerae*". *Infection and Immunity.* 56. 11. (1988): 2891–2895.
- Victoria, B. "Identificación de aislamientos de *Leptospira* por métodos serológicos y genéticos". *Rev. Cubana Med. Trop.* 54. 1. (2002): 48–51.
- Wang, Z.; Jin, L. y Wegrzyn, A. "Leptospirosis vaccine". *Microb. Cell Fact.* 6. (2007): 39.
- Yamaguchi, K.; Yu, F. y Inouye, M. "A single amino acid determinant of the membrane localization of lipoproteins in *E. coli*". *Cell.* 53. 3. (1988): 423–432.
- Yan, W; *et ál.* "Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model". *Microbes Infect.* 11. 2. (2009): 230–237.
- Zhang X; *et ál.* "Expression and comparative analysis of genes encoding outer membrane proteins LipL21, LipL32 and OmpL1 in epidemic leptospires". *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* 37. 10. (2005):649–656.
- Zuerner, R; Knudtson, W.; Bolin, C. y Trueba, G. "Characterization of outer membrane and secreted proteins of *Leptospira interrogans* serovar Pomona". *Microbiol. Pathog.*, 10. 4. (1991):311–322.