INVESTIGACIÓN

Caracterización preliminar de antígenos reconocidos por sueros de individuos vacunados con vax-SPIRAL® en preparaciones de membrana externa de Leptospira pomona *serovar* mozdok

✍ Mariela Naranjo, Maylen Machado, Marta González, Roger Medina, Erick Abreu, Jennifer Abreu, Niurka Batista, Vismar Torres, Andrés González, Julio Oramas

Centro de Investigación-Producción de vacunas. Ave. 27 # 19805 e/ 198 y 202, La Coronela, La Lisa, Ciudad de La Habana, AP 16017, CP 11600
Fax: 53(7) 2086075; E-mail: marielanar@finlay.edu.cu

RESUMEN

Se realizó la caracterización preliminar de los antígenos reconocidos en preparaciones de membrana externa de *Leptospira pomona* serovar *mozdok,* por el suero de individuos inmunizados con la vacuna trivalente antileptospirósica vax-SPIRAL®. A partir de la solubilización de los componentes de la membrana externa de *Leptospira interrogans* serovar *mozdok* por el método de Nunes-Edwars. Se realizó, además, la caracterización de las fracciones obtenidas, y se determinó el peso molecular de las proteínas presentes en ellas, así como su capacidad inmunogénica, mediante las técnicas de *western* y *dot blot*. Los resultados demostraron que el método empleado no es adecuado en la identificación de antígenos con fines vacunales. Se obtuvo respuesta humoral a antígenos no presentes en las preparaciones de membranas externas. La tinción con azul de Coomassie mostró un perfil caracterizado por 16 bandas: 6 bandas mayoritarias, entre ellas, 49.4, 45.8, 36.7, 28.3 y 21.0 kDa, y 10 bandas minoritarias, como 66.4, 57.2, 34.1 y 32.8 kDa. La tinción con plata reflejó la presencia de lipopolisacáridos. Con las técnicas de *dot* y *western blot* se apreció el reconocimiento de esas proteínas por el suero de individuos vacunados. La respuesta humoral estuvo dirigida principalmente a las bandas 66.1, 58.3, 47.2, 45.3, 34.5, 30.0, 29.8 y 17.2 kDa.

Palabras claves: Leptospira, proteínas de membrana externa, OMP, SDS, extracción, purificación

Biotecnología Aplicada 2006;23:28-33

ABSTRACT

Preliminary characterization of the antigens recognized by sera from vax-SPIRAL® vaccinees in outer membrane preparations from Leptospira pomona serovar mozdok. The preliminary identification of antigens recognized by sera from individuals vaccinated with the antileptospirosic vaccine vax-SPIRAL® in outer membrane proteins preparations from Leptospira pomoma serovar mozdok was made. In this paper we are beginning with the solubilization of the outer membrane components of Leptospira interrogans serovar mozdok, using the Nunes-Edward method. In addition we carried out the characterization of obtained fractions, the molecular weight of the protein present in this fractions and its immunogenic capacity by western and dot blot were determinate. Ours results shows that this method is not adequate to identify antigens for vaccine purposes. Humoral response was addressed to antigens absents in the outer membrane preparations with the aforementioned method. Coomassie stain showed a profile characterised by 16 bands; 6 principal bands, 49.4, 45.8, 36.7, 28.3 and 21.0 kDa and 10 lessening bans such as 66.4, 57.2, 34.1 y 32.8 kDa. The silver stain showed the presence of lipopolizacaride. Dot and western blot techniques showed the recognition of these proteins by the sera from individuals vaccinated. The humoral response was addressed mainly to the bands of 66.1, 58.3, 47.2, 45.3, 34.5, 30.0, 29.8 y 17.2 kDa.

Key words: Leptospira, outer membrane proteins, OMP, SDS, extraction, purification

*I*ntroducción

La leptospirosis es una enfermedad de amplia distribución mundial [1]. La mayoría de las vacunas disponibles contra ella hasta el momento, tanto para humanos como para animales, consisten en células completas inactivadas por métodos físicos (calor) o químicos (formaldehído o fenol) [2-6]. La protección conferida por la mayoría de estas vacunas es limitada, pues no protegen a los animales del desarrollo asintomático de infecciones renales y de la subsiguiente leptospiruria, y estos se convierten, entonces, en portadores silentes que ponen en peligro la vida de las personas que entran en contacto con ellos, perpetuando así la propagación de la enfermedad de animal a animal [7].

Para que un agente inmunógeno pueda considerarse eficaz en el control de la leptospirosis, debe poseer las siguientes propiedades: ser seguro para su uso, proteger contra la enfermedad clínica y la infección renal e inducir una inmunidad relativamente larga [7].

La transmisión urinaria es el único modo conocido para la diseminación natural de Leptospira entre los animales y el hombre. De ahí que la capacidad del agente inmunógeno para prevenir la infección renal sea relevante en el control de la leptospirosis. Por ello, se debe trabajar en el desarrollo de una nueva generación de vacunas más efectivas, basadas en preparaciones de componentes de membranas externas de *Leptospira interrogans*. Se conoce que estas membranas no solo son inmunogénicas y capaces de inducir una respuesta protectora en los animales inmunizados, comparable con la respuesta inducida frente a una inmunización con células enteras [4, 8, 9], sino que también, y es lo más importante, previenen la infección renal [6].

1. Vinet JM. Leptospirosis. Curr. Opin. Infect. Dis 2001;14:527-38.

2. González M, Naranjo M, Rodríguez Y, Oliva R, Batista N, González I, Izquierdo L, Sierra G. Vacuna antileptospirósica adsorbida para uso humano. Primer ensayo evaluativo de reactogenicidad e inmunogenicidad en un grupo de voluntarios adultos. VacciMonitor 1997;6: 12:2-10.

3. Masuzawa T *et al.* Comparison of protective effects with tetravalent glicolipid antigens and whole cell-inactivated vaccine in experimental infecction of *Leptospira*. Zlb. Bak 1991;35:199-208.

4. Russell FB, Nancy E, Auran, Russell CJ. Immunogenicity of whole cell and outer envelope leptospiral vaccine in hamsters. Infect Immun 1974;10(5):1051-6.

✍ Autor de correspondencia

Varios reportes indican que estas membranas contienen importantes componentes involucrados en la infección, transmisión, virulencia, supervivencia y adaptación a las condiciones ambientales de la Leptospira, además de ser excelentes candidatos para el diagnóstico y la elaboración de vacunas de ADN [10-15].

Entre los componentes de la membrana externa del agente patógeno, se identificó el lipopolisacárido (LPS) o sustancia semejante al lipopolisacárido (LLS, siglas en inglés) como biomolécula capaz de inducir una respuesta inmune protectora [16-18]. Se ha reportado, además, que algunas proteínas de esta membrana son capaces de potenciar la respuesta al LPS o LLS e inducir niveles superiores de protección en hámsters [19].

Son numerosos los reportes que describen diferentes métodos de purificación de proteínas de membrana externa (OMP, siglas en inglés) [10-20]. Esta diversidad está dada por diferencias en la extracción, que es el paso más importante en el proceso de obtención, pues en él se definen, no solo la cantidad de OMP extraídas, sino también la capacidad de proporcionar inmunidad, la cantidad de contaminantes que es necesario eliminar, así como las condiciones en que va a comenzar el proceso de purificación [21]. Durante este proceso es muy importante también tener en cuenta el tipo de detergente que se ha de emplear: dodecilsulfato de sodio (SDS), tritón X-100 (TX-100), tritón X-114 (TX-114), desoxicolato de sodio N-lauryl sarcosinato (Sarcosyl), entre otros.

El método estándar para el aislamiento de la membrana externa de Leptospira consiste en el tratamiento de las cepas con una solución salina hipertónica, lo que provoca la alteración salina de la célula, con lo cual la membrana externa se disocia del cilindro protoplasmático (PC, siglas en inglés) y se libera al detergente iónico SDS [22, 23].

En Cuba se obtuvo una vacuna trivalente de células enteras de Leptospira de los serovares *canicola*, *copanhageni* y *mozdok*, inactivadas y adsorbidas en gel de hidróxido de aluminio (vax-SPIRAL®). Se conoce que existe una respuesta inmune humoral en los seres humanos, gracias a la técnica de inmunización pasiva de hámsters. Por tanto, se hace necesario caracterizar esta respuesta y conocer hacia qué antígenos relevantes va dirigida, para así identificar, además del LPS o LLS, otras biomoléculas, como las proteínas, que pudieran estar implicadas en el establecimiento de un estado inmune.

El objetivo fundamental de esta investigación es la identificación preliminar de los antígenos reconocidos en preparaciones de membrana externa de *Leptospira pomona* serovar *mozdok*, por sueros de individuos inmunizados con la vacuna trivalente antileptospirósica vax-SPIRAL®. Además, realizar una comparación entre el método de solubilización de componentes de membrana externa propuesto por Auran y cols. [22] y la modificación de este método propuesta por Nunes-Edwards [23], para determinar con cuál de ellos se obtiene un preparado que contenga el mayor número posible de antígenos que pueda ser empleado en la caracterización de sueros anti-vax-SPIRAL®.

Materiales y métodos

Cultivo de las células y obtención de la biomasa

La cepa de *Leptospira interrogans*, serogrupo *Pomona*, serovar *mozdok*, se cultivó en media libra de proteínas [24], y como fermentador se empleó el Chemap de 35 L. Para ello, se partió de un inóculo al 10% (v/v), crecido en un medio Tween-albúmina [25], que se mantuvo en zaranda orbital a 28 °C durante 7 días con agitación a 130 rpm. El proceso de Batch incrementado se inició con 20 L de cultivo, y para la suplementación se adicionaron 10 L de medio libre de proteínas fresco entre las 18 y 22 horas de iniciado el proceso. Se tomaron muestras en el momento de la inoculación del cultivo (muestra I), antes de la suplementación (muestra II) y al final de la fermentación (muestra III), a las cuales se les realizaron los controles de crecimiento, mediante la determinación de la densidad óptica (DO) a 400 nm en un espectrofotómetro: viabilidad (por observación directa al microscopio de campo oscuro), tinción de Gram y virulencia [26]. Se controlaron los parámetros de pH, porcentaje de oxígeno disuelto, flujo de aire y temperatura.

Al cabo de las 48 horas, se centrifugó el cultivo a 3 260 g durante 30 minutos a 4 °C. Se determinó el peso del precipitado para obtener el rendimiento en gramos de biomasa húmeda. Finalmente, el precipitado se lavó tres veces con la solución tampón fosfato salino (PBS, siglas en inglés), pH 7.2.

Extracción de las OMP

La extracción de las OMP se desarrolló mediante la técnica de solubilización con SDS, descrita por Auran y cols. (1972) y modificada por Nunes-Edwards (1985). La biomasa húmeda obtenida por cada 5 litros de cultivo se resuspendió en 10 mL de agua destilada, se mezcló con 200 mL de solución de NaCl 1 M y se mantuvo durante 2 horas a 25 °C. Luego se centrifugó a 4 260 g durante 30 minutos y se resuspendió en 10 mL de agua destilada. A continuación se trató con 200 mL de SDS al 0.04% durante 30 minutos y se realizaron cuatro centrifugaciones, la primera a 4 260 g y las restantes a 23 200 g. Finalmente se llevó a cabo una centrifugación a 40 000 g. El precipitado que se obtuvo en cada una de las centrifugaciones se resuspendió en 10 mL de PBS y seguidamente se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Lowry [27].

SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida

Se desarrolló una electroforesis discontinua según el método de Laemmli [28]. Se aplicaron 20 µg de las muestras en el gel que, después de completada la electroforesis (30 mA y 100 y 120 V durante 1 hora), se tiñó con azul de Coomassie [26] y 5 µg, para el que se usó en la tinción con plata para LPS [29]. Como patrón de peso molecular (PPM) se empleó una mezcla de proteínas de 94, 57, 43, 30, 20.1 y 14.4 kDa (Pharmacia Biotech).

Inmunotransferencia

Western blot

Esta técnica se desarrolló según Burnette [30]. Posterior a la electroforesis, las muestras se transfirieron

5. WHO. Report of the Discission of the WHO working group on leptospiral vaccine development and vaccinology. Nagoya, Japan; 1993.

6. Schreiber P, Martin V, Najbar W, Sanquer A, Gueguen S, Lebreux B. Prevention of renal infection and urinary shedding in dogs by leptospira vaccination. Vet Microbiol 2005;108(1-2):113-8.

7. Glosser JW, Johnson RC, Sulzer CR, Auran NE. Immunogenic properties of a leptospiral outer envelope bacterin in hamster and foxes. Am J Vet Res 1974; 35(5):681-4.

8. Russel FB, Russell CJ. Immuno-genicity and Humoral and Cell-mediated imnune responses to leptospiral whole cell outer envelope and protoplasmic cilinder vaccines in hamsters and dogs. Am J Vet Res 1982;43(5):835-40.

9. Yan Y, Chen Y, Liou W, Ding J, Chen J, Zhang J *et al*. An evaluation of the serological and epidemiological effects of the envelope vaccine to *Leptospira*. Chin Med Assoc 2003; 66(4):224-30.

10. Nally JE, Whitelegge JP, Aguilera R, Pereira MN, Blanco DR, Lovett MA. Purification and proteomic analysis of outer membrane vesicles from a clinical isolate of *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*. Proteomics 2005; 5(1):144-52.

11. Okuda M, Sakai Y, Matsuuchi M, Oikawa T, Watanabe M, Itamoto K *et al*. Enzyme-linked inmunoabsorbent assay for the detection of canine Leptospira antibodies using recombinant OmpL1 protein. Vet Med Sci 2005;67(3):249-54.

12. Hsie WJ, Chang YF, Chen CS, Pan MJ. Omp52 is a growth-phase-regulated outer membrane protein of *Leptospira santarosai* serovar *shermani*. FEMS Microbiol Lett 2005;243(2):339-45.

13. Koizumi N, Watanabe H. Molecular cloning and characterization of a novel leptospiral lipoprotein with OmpA domain. FEMS Microbiol Lett 2003;226(2):215-9.

14. Gamberini M, Gomez RM, Atzingen MV, martins EA, Vasconsellos SA, Romero EC *et al*. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potencial vaccine candidates against leptospirosis. FEMS Microbiol Lett 2005;244(2):305-13.

15. Cullen PA, XU X, Matzunaga J, Sanches Y, Ko AI, Haake DA, *et al*. Surfaceome of *Leptospira ssp*. Infect Immun 2005;73(8): 4853-63.

16. Masuzawa T, Nakamura R, Shimitzu T, Iwamoto Y, Monte T, Yanahihara Y. Imnunological characteristics of glicolipid antigen of *Leptospira interrogans* serovar *lai*. Infect Immun 1989; 57:2502-06.

17. Masuzawa T. Protective activity of glycolipid antigen against infection by *Leptospira interrogans* serovar *canicola*. J Gen Microbiol 1990;136(2):227-30.

18. Nally JE, Chow E, Fishbein MC, Blanco DR, Lovett MA. Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections. Infect Immun 2005;73(6): 3251-60.

19. Jost BH, Adler B, Faine S. Experimental immunization of hamsters with lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans*. J Med Microbiol 1989;29: 115-20.

a membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm, con el empleo de un sistema tampón compuesto por tris 20 mM y metanol 20% (v/v). La transferencia se desarrolló a 0.2 A, durante 2 horas con una fuente de alto voltaje. Las tiras de nitrocelulosa se incubaron durante 1 hora a 37 °C en una solución de bloqueo que contenía 5% de leche descremada (Merck) en PBS (p/v) y luego, 14 horas a 4 °C con los sueros apropiados diluidos 1/3 en PBS-suero de albúmina bovina 1% (p/v) (BSA, siglas en inglés) y tween 20, 0.05% (v/v). Se realizaron cinco lavados con PBS-detergente NP_{40} 0.01% (v/v) y se incubaron con proteína A conjugada a peroxidasa (Sigma) diluido 1/6 000 en el mismo tampón durante 1 hora. Finalmente, se lavaron las membranas de nitrocelulosa y las bandas se revelaron con el uso de 4 cloro-1 naftol y peróxido de hidrógeno como sustrato de la peroxidasa (5 mg de 4 cloro-1 naftol, 1 mL de metanol, 24 mL de TBS y 15 µL de H_2O_2 al 30% (v/v).

Dot blot

Se aplicaron 10 µL de las muestras al vacío directamente sobre la membrana de nitrocelulosa. Las tiras se incubaron durante 1 hora a 37 °C en solución de bloqueo y a continuación se siguió la misma metodología descrita anteriormente para el *western blot.*

Obtención de los sueros

Se usaron los sueros de individuos vacunados con una y dos dosis de vax-SPIRAL® con un intervalo entre ellas de 6 semanas [2], y el suero de individuos no vacunados, como control negativo.

Determinación de los pesos moleculares

Se obtuvo la curva de regresión a partir de los valores del logaritmo del peso molecular (Log PM) de los PPM y las movilidades electroforéticas observadas. El peso molecular correspondiente a las diferentes bandas visualizadas en la electroforesis y las reconocidas en el *western blot* se calculó por interpolación en la curva de regresión obtenida.

Definición de la DL_{50}

La determinación de la DL_{50} se realizó mediante el método descrito por Reed y Muench [31].

Resultado y discución

La vacuna vax-SPIRAL®, producida por el Instituto "Finlay", está compuesta por células enteras de *Leptospira interrogans* de los serovares *canicola, copenhageni* y *mozdok*, y protege de la infección contra la leptospirosis. En nuestro país, antes del registro médico, se realizaron ensayos clínicos en nuestro país en los que se demostró una eficacia clínica del 93%, por lo que se decidió vacunar a todo el personal que podía ser de riesgo desde el año 1996.

Con el objetivo de identificar los antígenos de la membrana externa del serovar *mozdok* de *Leptospira interrogans*, serogrupo *pomona*, involucrados en la respuesta inmune de los individuos vacunados con vax-SPIRAL®, este estudio comenzó con una fermentación que garantizara la biomasa necesaria para la extracción de los componentes de OMP.

Las condiciones de cultivo determinan o condicionan la expresión de los componentes, tanto estructurales como solubles, de un microorganismo [32]. En el caso de *Leptospira interrogans*, el control de su actividad biológica es un elemento importante, ya que esta se relaciona estrechamente con la capacidad de inducir protección en individuos inmunizados [2]. Debido a esto, la virulencia representa el parámetro fundamental que se debe controlar en aquellos cultivos destinados a la purificación, tanto de componentes estructurales como de componentes solubles. Los resultados de la fermentación de 30 L de *Leptospira mozdok* se exponen en la tabla 1. El rendimiento de biomasa húmeda fue de 26.62 g, lo cual equivalió a 0.88 g/L de cultivo.

Una vez obtenida la biomasa, se procedió a la extracción de las OMP. Debido a que era mayor el volumen de cultivo con respecto a lo que se reporta, se ajustaron los tiempos de los tratamientos con la solución de NaCl (2 horas) y con SDS (30 minutos), de acuerdo con lo observado al microscopio de campo oscuro.

Otro de los objetivos de este estudio fue la comparación de las dos metodologías de purificación de OMP descritas en la literatura por Auran y cols. [22] y Nunes-Edwards y cols. [23]. Según estos últimos, las dos centrifugaciones adicionales enunciadas en su metodología en comparación con lo reportado por Auran y cols. realizadas a 23 200 g/ 30 minutos previa a la ultracentrifugación, se hacen con el objetivo de eliminar los cilindros protoplasmáticos. En el presente trabajo se realizó una centrifugación adicional con vistas a garantizar lo reportado por esos autores, ya que en las experiencias de trabajos anteriores, no se ha garantizado la eliminación completa de este componente. Sin embargo, los precipitados obtenidos no fueron eliminados sino resuspendidos en 10 mL de PBS y determinada su concentración por el método de Lowry (tabla 2), así como su patrón electroforético por tinción con azul de Coomassie (figura 1), para ver si en estas fracciones no se pusieron componentes antigénicos que pudieran estar relacionados con la inducción de la respuesta inmune.

Las fracciones mostraron un perfil electroforético complejo, en el cual se observaron bandas proteicas, localizadas aproximadamente desde los 14 kDa hasta más de 80 kDa, similar a lo reportado por otros autores [33-35].

Tabla 1. Resultados del cultivo de *Leptospira interrogans* serovar *mozdok* con vistas a la obtención de biomasa para la solubilización de componentes de membrana externa

Parámetros controlados	Muestreos		
	I	II	II
Temperatura (°C)	28.4	29.6	28.2
Flujo de aire (L/min)	2	2	2
Porcentaje de oxígeno disuelto (%)	100	98	60
DO (400 nm)	0.031	0.526	0.661
Gram	S	S	S
Viabilidad	S	S	S
Virulencia	S	S	S

I = Muestreo realizado en el momento de la inoculación del cultivo.

II =Muestreo realizado antes de la suplementación.

III = Muestreo realizado al finalizar la fermentación.

S = Resultado satisfactorio (número de DL_{50} en el rango establecido).

20.Haake Da, Matsunaga J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. Infect Immun 2002; 70(9):4936-45.

21.Janson C, Uppsala LAS. Protein purification. Principle, high resolution methods and aplication. American Press USA; 1991.

22.Auran NE, Johnson RC, Ritzi DM. Isolation of the outer enveloped of Leptospira and its inmunogenic properties in hamsters. Infect Immun 1972;65:968-75.

23.Nunes-Edwards PL, Thierman AB, Bassford PJ, Straman LV. Identification and characterization of the protein antigens of *Letospira interrogans* serovar *hardjo*. Infect Immun 1985;48:492-7.

24.Estévez L. Evaluación de un medio libre de proteínas químicamente definido para *Leptospira interrogans*. VacciMonitor 1999;6:11:2-10.

25.Ellinghausen HC, Mc Cullough WC. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 others serotype fraction of oleic albumin complex and medium of albumin and polysorbate 80. Am J Vet Res 1995;26:45-51.

26.Suplikp V. Metodología para la evaluación de la virulencia de *L. interrogans*. J Vet 1963;7(3):9-13.

27.Lowry OH. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-8.

28.Laemmli NK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. Nature 1970;227: 680-5.

29.Hitchcock PJ, Brown TM. Morphological herogenicity among Salmonella lipopolysacharide chemotypes in silver polyacrilamide gels. J Bact 1993;154: 269-277.

30.Burnnette WN. Western Blotting electrophoretic transfer of protein from sodium dodecyl suphate polyacrylamide gel to unmodified nitrocelulose and radiographic detection with antobodies and radioiodinated protein A. Analysis Biochemestry 1980;112:192-200.

31.Reed LJ, Muench H. Asimple method of estimating fifty percent endpoints. Am J Hyg 1938;27:493-7.

Tabla 2. Rendimientos durante el proceso de obtención de los componentes de membrana externa solubilizados con SDS

Muestra por cada centrifugación	Concentración de proteínas por Lowry (mg/mL)	Volumen total de cada muestra (mL)
C2 (FI)	6.210	10
C3 (FII)	1.139	10
C4 (FIII)	0.614	10
UC (FIV)	4.560	10

C2: Precipitado obtenido de la segunda centrifugación.
C3: Precipitado obtenido de la tercera centrifugación.
C4: Precipitado obtenido de la cuarta centrifugación.
UC: Precipitado obtenido ultracentrifugación.

La electroforesis de estas fracciones estuvo caracterizada por aproximadamente 16 bandas comunes: 6 mayoritarias y 10 minoritaria. Desde el punto de vista cualitativo no se evidenciaron diferencias entre los patrones electroforéticos de las fracciones (FI-FIV); aunque sí las hubo desde el punto de vista cuantitativo, en la intensidad de las bandas de la FIV con respecto a las restantes fracciones, así como en la concentración de proteínas para cada fracción (tabla 2).

Al aplicar la regresión lineal (descrita en la sección de materiales y métodos), se determinó que las bandas mayoritarias correspondían aproximadamente a 49.4, 45.8, 36.7, 35.3, 28.3 y 21.0 kDa, mientras que entre las minoritarias se encontraban bandas de 66.4, 57.2, 34.1 y 32.8 kDa.

Estos resultados son similares a los estudios previos de Nicholson y Prescott [36], en los que se reportó la utilización del detergente sarcosyl y de la sonicación para la extracción de OMP de *Leptospira alstoni* serovar *grippotyphosa*, *L. borgpetersenii serovar hardjo* y *L. interrogans* serovar *autumnales*, *bratislava*, *canicola*, *icterohaemorrhagiae* y *pomona*. Esta vez se identificaron siete bandas proteicas, con una masa molecular de 77.0, 66.0, 59.5, 42.0, 35.5, 24.0 y 18.0 kDa, común a las tres especies patógenas analizadas. El antígeno de 44.0 kDa se tiñó pobremente con azul de Coomassie, lo cual pudo deberse, tal vez, a que es una lipoproteína, una glicoproteína o por ser poca la cantidad.

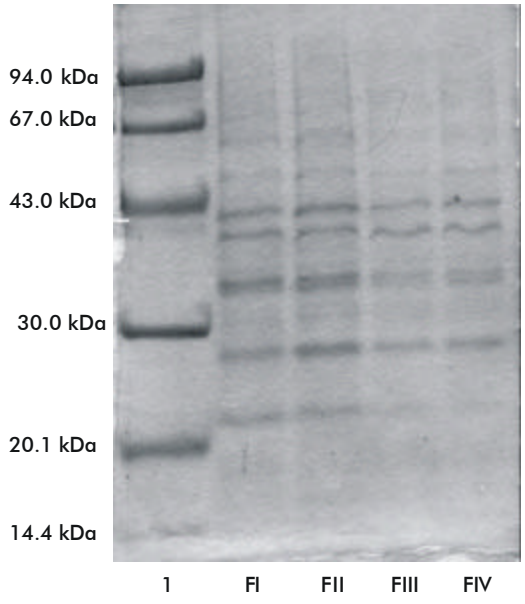

Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5% con SDS. Se aplicaron 20 μg de las fracciones obtenidas después de la segunda centrifugación (FI), tercera centrifugación (FII), cuarta centrifugación (FIII) y ultracentrifugación (FIV) del proceso de extracción de OMP.

Con ambos métodos de extracción, tanto el que usa sarcosyl como el que usa SDS ocurre la contaminación de las proteínas con componentes endoflagelares, los cuales están representados por la doble banda, localizada aproximadamente en 34.5 y 36 kDa [23-33]. En este estudio se identificó esta doble banda localizada en los 35.3 y 36.7 kDa, ya que su intensidad se corresponde con lo reportado en la bibliografía [30-33]. En la fracción insoluble obtenida por ambos métodos pueden estar presentes proteínas asociadas tanto al peptidoglicano como a la membrana externa.

Según Haake y cols. [32], quienes realizaron estudios usando tritón X-114 al 0.1%, la proteína de 66 kDa (observada en el perfil electroforético de este trabajo) unida a otras de 35 y 39 kDa parecen ser únicas de las cepas virulentas. En contraste, las proteínas de 31 kDa (OmpL1) y 38 kDa parecen ser únicas de las cepas atenuadas, lo que justifica su ausencia en el perfil electroforético que se encontró. Si se tiene en cuenta que vax-SPIRAL® es una vacuna de células enteras inactivadas, no atenuadas, la respuesta estará dirigida a los principales antígenos protectores de las cepas virulentas y no a los antígenos de cepas atenuadas. Las cepas virulentas y atenuadas contienen cantidades similares de las proteínas principales de la fase detergente con pesos moleculares de 41 y 44 kDa. Esta última proteína puede ser la que en este estudio se localizó en los 45.8 kDa, debido a que su movilidad electroforética pudo haber estado distorsionada por la presencia de LPS de Leptospira (información no mostrada). Lo mismo pudo haber sucedido con la proteína reportada por Haake y cols. [32] en los 59.5 kDa y observada en nuestro caso en los 75.2 kDa. La presencia de LPS o LLS en las muestras de Leptospira sujetas al SDS-PAGE, manifiestan un patrón característico de bandas en la tinción con plata y con *western blot* [32]. La presencia de esta molécula en las preparaciones, no obstante, es de extraordinaria importancia si se tiene en cuenta que son numerosos los hallazgos que reconocen al LPS como principal antígeno responsable de la inmunidad contra la leptospirosis [8, 17, 19, 34].

La banda de 32.8 kDa parece corresponderse con la proteína principal de membrana externa (MOMP, siglas en inglés) reportada por otros autores aproximadamente en los 32 kDa. La proteína correspondiente a la banda que está en los 49.4 kDa puede ser la que Brown y cols. [33] identificaron alrededor de los 50 kDa. Estos resultados son similares a los reportados por Chapman y cols. [37] al evaluar la respuesta inmune en personas vacunadas con una vacuna bivalente *hardjo-pomona*, en la cual las principales bandas proteicas fueron las de 32 kDa y el doblete de 34.5 y 35 kDa, además de otros componentes.

32. Haake DA, Walker EM, Blanco DR, Bolin CA, Miller JN, Lovett MA. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar *griphotiphosa* during *in vitro* cultivation. Infect Immun 1991;59(3):1131-40.

33. Brown JA, Lefebver RB, Pan MJ. Protein and antigens profile of prevalent serovar *Leptospira interrogans*. Infect Immun 1991;59(5):1772-7.

34. Gitton X, Fontaine GA, Francois A, Geniere JP. Immunoblotting study of the antogenic relationship among eigth serogroups of *Leptospira*. Vet Microbiol 1992;32:293-303.

35. Luo YH, Yan J, Mao YF, Li SP. Determination of the genus-specific antigens in outer membrane proteins from the strains of *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* with different virulence. Infect Immun 2004;66(7):3210-7.

36. Nicholson VM, Prescott JF. Outer Membrana Proteins of the three pathogenic *Leptospira species*. Vet Microb 1993;36:123-38.

37. Chapman AJ, Everard COR, Fine S, Adler B. Antigens recognized by the human immune response to severe leptospirosis in Barbados. Epidemiol Infect 1991;107: 143-55.

La proteína localizada en los 21 kDa (figura 1) fue reportada por Haake [38] como una de las proteínas aisladas con sucrosa y fue identificada por otros autores como Lip21, una de las OMP más abundantes en la superficie celular de la Leptospira [15].

Atendiendo a que no se observaron diferencias cualitativas entre los perfiles electroforéticos de las fracciones FI a la FIII, mostradas en la figura 1, se decidió seleccionar la FI y la FIV para evaluar su capacidad inmunogénica, teniendo en cuenta las posibles diferencias que pudieran existir en cuanto a composición antigénica entre ambas fracciones, originadas por las condiciones de centrifugación empleadas para la obtención de cada una, que no pueden ser definidas por el perfil electroforético.

A partir de estas dos fracciones, se prepararon las variantes A = FI y B = FIV, ajustadas a la misma concentración y absorbidas en gel de hidróxido de aluminio. No se detectaron proteínas no absorbidas al gel de hidróxido de aluminio, lo que muestra un porcentaje de absorción elevado.

En la figura 2 se muestra el reconocimiento de cada una de las fracciones por el suero de individuos vacunados con vax-SPIRAL®. Obsérvese que este reconocimiento es menor tras la aplicación de la primera dosis, con respecto al suero de aquellos seres humanos vacunados con dos dosis, en que el reconocimiento es de mayor intensidad, lo cual se debe al efecto *booster* de esta última dosis. En contraste, hubo reconocimiento en el suero control negativo. Además se puede apreciar el reconocimiento del LPS por el suero de estos individuos vacunados, lo que indica que la respuesta inmune de vax-SPIRAL® también está dirigida hacia el LPS como uno de los componentes principales de la membrana externa. Ello confirma lo planteado por otros autores, quienes expresan que el LPS juega una función importante en la inmunidad contra la Leptospira y es capaz de inducir respuesta inmune protectora, al conferir niveles de protección superiores cuando se combina con OMP capaces de potenciar esta respuesta [16-19].

Figura 2. Resultados del *dot blot*, en los que se aprecia el reconocimiento de 1) células completas de *L. mozdok*, 2) FI (fracción obtenida después de la segunda centrifugación), 3) FIV (fracción obtenida después de la ultracentrifugación), 4) LPS de *L. mozdok* frente al suero de individuos vacunados con una y dos dosis de vax-SPIRAL® . Fueron aplicados 10 µL de las muestras en cada pocillo. Como control negativo se usó el suero de individuos no inmunizados con la vacuna. Ultracentrifugación (FIV) del proceso de extracción de OMP.

En la figura 3 se muestran los resultados del *western blot* al evaluar el reconocimiento de los componentes de membrana externa (FI y FIV) por el suero de individuos vacunados con una y con dos dosis de vax-SPIRAL®, y el suero de individuos no vacunados. En términos de número de bandas y en intensidad, existe un mayor reconocimiento de las OMP por parte del suero de individuos inmunizados con dos dosis de la vacuna. Esto demuestra una vez más el efecto *booster* de una segunda dosis. Los resultados de la inmunotrasferencia de la fracciones FI y FIV reflejan que el suero de individuos vacunados con dos dosis reconoce 8 bandas comunes, entre las cuales existen diferencias desde el punto de vista cuantitativo. Además se aprecia el reconocimiento de dos proteínas adicionales en la última fracción (FIV). Estas bandas pudieran representar proteínas precipitadas durante la ultracentrifugación del sobrenadante, razón por la cual no están presentes en FI. Aplicando la regresión lineal, se pudo determinar que estas bandas correspondían a 66.1, 58.3, 47.2, 45.3, 34.5, 30.0, 29.8 y 17.2 kDa para el caso de las bandas identificadas en ambas fracciones y 26.2 y 24.1 kDa para las bandas identificadas solamente en FIV.

Las bandas proteicas, tanto en FI como en FIV, reconocidas por el suero de individuos inmunizados con una y dos dosis de la vacuna antileptospirósica: aparecen en los 66.1, 58.3, 45.3, 34.5, 29.8 parecen corresponderse con las bandas del perfil electroforético de 66.4, 57.2, 45.8, 34.1 y 28 kDa, respectivamente.

En estos resultados hay, además, gran similitud con lo reportado por Nicholson y Prescott [36], quienes al revelar el inmunoblot de las fracciones obtenidas de las diferentes cepas de Leptospira, encontraron seis antígenos comunes con las

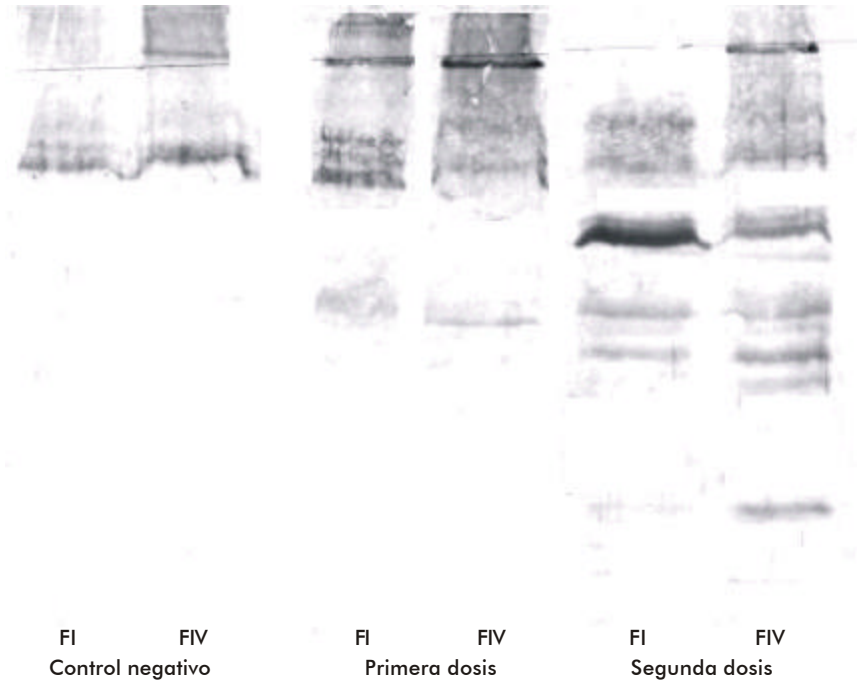

Figura 3. Resultados del *western blot* de las fracciones FI (fracción obtenida después de la segunda centrifugación) y FIV (fracción obtenida después de la ultracentrifugación) frente al suero de personas vacunadas con una y dos dosis de vax-SPIRAL® y suero de individuos no vacunados.

38.Haake DA. Inventor. The regents of the university of California. Asignee. *Leptospira* outer membrana proteins. US patent; 26274, 1997;(July):24.

siguientes masas moleculares 66, 59.5, 44.0, 42.0, 35.5 y 18.0 kDa.

Aunque en el perfil electroforético (figura 1) no se obtuvieron bandas con un peso molecular menor que 21 kDa, en el *western blot* se evidenció una banda en los 17.2 kDa, que bien pudiera corresponderse con la banda de 18 kDa reportada por Nicholson y Prescott [36]. La ausencia de esta banda en la electroforesis puede deberse a que quizás su concentración esté por debajo del límite de detección de la tinción con azul de Coomassie, pero que sea suficientemente inmunogénica como para ser reconocida por el suero de individuos vacunados con vax-SPIRAL®, aun cuando solo se haya administrado una sola dosis.

Esta misma razón puede explicar la aparición de otras tres bandas presentes en el *western blot* y ausentes en la electroforesis. Estas bandas son las de 30.0 kDa, común para ambas fracciones (FI y FIV), y las dos bandas de 24.1 y 26.2 kDa que aparecen solamente en FIV. La banda de 24.1 kDa parece ser la reportada por Nicholson y Prescott [36] en la electroforesis y la de 30.0 kDa, aunque poco mencionada en la literatura, la reportó Haake por primera vez en 1997 [36], utilizando una prensa francesa para su aislamiento. La banda de 26.0 kDa no había sido reportada con anterioridad. Este último hallazgo es de suma importancia, pues por primera vez se reporta una proteína de membrana externa de *Leptospira interrogans* con ese peso molecular implicada en la inmunidad, la que pudiera ser utilizada luego de futuros estudios confirmatorios, para el diseño de vacunas de nueva generación contra la leptospirosis humana, basadas en componentes definidos, altamente purificados o para mejorar la vacuna ya existente. Es necesario, además, determinar si esta proteína está involucrada en la inducción de una respuesta protectora y, lo que es más importante, en la prevención de la infección renal.

Al evaluar el método de Nunes-Edwards [16], que no es más que una modificación del método descrito por Auran y cols. [15], con el cual los investigadores reportan la eliminación del cilindro protoplasmático mediante dos centrifugaciones anteriores a la ulcentrifugación, se pudo observar, según los resultados, que en estas fracciones se encontraban componentes inmunogénicos, lo cual es indeseable para el objetivo de este estudio.

Siendo uno de los objetivos de nuestro trabajo, la caracterización de la respuesta inmune en personas vacunadas con vax-SPIRAL® mediante el reconocimiento de OMP, es necesario contar con una peroración en la que estén representados todos los antígenos. Por todo ello, y según los resultados alcanzados, para estudios futuros se sugiere la metodología propuesta por Auran y cols. (1972), en la que no se tienen en cuenta las centrifugaciones parciales que se reportan antes de la ultracentrifugación por Nunes-Edwards.

Estos resultados permiten identificar proteínas importantes desde el punto de vista de su inmunogenicidad, representada por la respuesta inducida a uno de los antígenos de la vacuna vax-SPIRAL® (*L. mozdok*), elementos necesarios que sustentarán estudios futuros encaminados a caracterizar estas fracciones desde el punto de vista de su correlación con la inducción de una repuesta protectora. De igual forma permitirán orientar a los investigadores hacia la purificación de estos antígenos para mejorar la vacuna existente o avalar formulaciones nuevas de segunda generación contra la leptospirosis humana.

Se evidenció el reconocimiento de OMP por el suero de individuos vacunados con vax-SPIRAL® mediante *dot* y *western blot*. Este último resultado mostró el reconocimiento de las bandas de 66.1, 58.3, 47.2, 45.3, 34.5, 30.0, 29.8 y 17.2 kDa para ambas fracciones y las bandas 26.2 y 24.1 kDa para FIV.

Por primera vez se identificó una proteína de 26.0 kDa reconocida por el suero de individuos vacunados, implicada en la inmunidad a Leptospira, que pudiera ser utilizada como antígeno en nuevas generaciones de vacunas.

La utilización de la metodología descrita por Nunes-Edwards para la extracción de OMP lleva implícita la pérdida de algunos antígenos que pueden ser importantes en la inducción de la respuesta inmune.

Se recomienda el uso de la metodología descrita por Auran y cols. cuando se necesite una preparación que contenga todos los antígenos que participan en la inducción de la respuesta inmune.

Recibido en julio de 2005. Aprobado en marzo de 2006.