

# Detección de proteínas de adhesión a fibronectina y colágeno presentes en *Leptospira interrogans* serovar Canicola

Gisele Reyes, Reinier Borrero, Aniel Moya, María de los Angeles Padrón, Michel Acosta, Rubén Cabrera, Luis García.

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave. 27 No. 19805. A.P.16017, C.P.11600, La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Correo electrónico: greyes@finlay.edu.cu

Como parte de los estudios encaminados a la obtención de una formulación vacunal por subunidades contra la leptospirosis humana, se describe la purificación y caracterización de las proteínas de unión a fibronectina y a colágeno en *Leptospira interrogans*. Las proteínas de la membrana externa fueron extraídas mediante la solubilización con Tritón X-114 y se aplicaron en una columna de afinidad de IgG AntiBSA-Sepharose 2B CL, para eliminar la BSA, contaminante principal del medio de cultivo en que crece el microorganismo. La muestra libre de BSA (no fijado) se aplicó a una columna de afinidad de fibronectina Sepharose 4B-CNBr, que permitió la separación y detección de una fracción que contenía una proteína de unión a fibronectina presente en la cepa 87 de *Leptospira interrogans* serovar Canicola, cuyo peso molecular fue estimado en 40 kDa. La proteína aislada demostró ser antigénica y conservada en los serovares Canicola, Copenhageni y Mozdok, en el ensayo de inmunodetección utilizado en este estudio (Dot blot). Para ello se utilizaron sueros específicos obtenidos en ratas infectadas experimentalmente con cada serovar y una mezcla de sueros de humanos convalecientes de leptospirosis. Las proteínas de membrana externa solubilizadas con Tritón X-114, libres de BSA, fueron aplicadas también a una columna de afinidad colágeno-Sepharosa 4B-CNBr, que permitió la purificación de una proteína de unión a colágeno con un peso molecular de aproximadamente 25 kDa, la cual resultó ser antigénica frente a sueros de humanos convalecientes de la enfermedad. Ambas proteínas seleccionadas (40 kD y 25 kD) podrían ser evaluadas como posibles inmunógenos en futuros estudios encaminados a la obtención de nuevos antígenos vacunales.

**Palabras clave:** *Leptospira*, colágeno, fibronectina, cromatografía de afinidad.

## Introducción

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de amplia distribución mundial causada por espiroquetas patógenas pertenecientes al género *Leptospira* (1). La infección en humanos ha dejado de ser considerada sólo un riesgo ocupacional para convertirse en una enfermedad reemergente, caracterizada por grandes brotes en centros urbanos de países en desarrollo (1, 2).

En la actualidad las vacunas disponibles constituidas por suspensiones de células inactivadas, como es el caso de la vacuna cubana vax-SPIRAL<sup>®</sup>, diseñada para establecer protección en humanos de alto riesgo frente a los serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona, han logrado controlar y reducir con elevada efectividad la letalidad de la leptospirosis humana. Sin embargo, estudios relativamente recientes indican la existencia de al menos ocho serogrupos no incluidos en esta formulación vacunal, cuya incidencia, en algunos casos, comienza a constituir un problema epidemiológico (3).

En tal sentido, las investigaciones se han encaminado a la identificación y evaluación de antígenos muy bien conservados como potenciales componentes de una nueva generación de vacunas que confieran una protección de amplio espectro (1, 4, 5).

Se han identificado algunas proteínas de membrana externa altamente conservadas e inmunogénicas en convalecientes, las cuales han mostrado diferentes niveles de protección cruzada en modelos animales (1, 6, 7). Sin embargo, son relativamente escasos los estudios encaminados a la identificación y evaluación de adhesinas de *Leptospira* que medien la adherencia y colonización.

La adhesión de microorganismos patógenos a las células y tejidos del hospedero ocurre a menudo a través de proteínas de unión a componentes de matriz extracelular, tales como fibronectina y colágeno. Estas proteínas contribuyen significativamente a la virulencia de un gran número de microorganismos patógenos y han mostrado resultados muy alentadores como antígenos en vacunas por subunidades, previniendo la colonización e infección *in vitro* e *in vivo* (8).

El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de detectar proteínas de adhesión a fibronectina y colágeno presentes en *Leptospira interrogans*, como parte de los trabajos encaminados a la obtención de una formulación antileptospirósica de amplio espectro para uso humano.

## Materiales y Métodos

### Cepas bacterianas

Se utilizó para el estudio la cepa vacunal 87 de *Leptospira interrogans* serovar Canicola, la cual fue originalmente

aislada a partir de muestras animales remitidas al Centro Nacional de Epizootiología y Diagnóstico Veterinario de Ciudad de La Habana, Cuba, y donada al Instituto Finlay. Se incluyeron, además, en diferentes ensayos las cepas vacunales 169 y 108 de *L. interrogans* serovares Copenhageni y Mozdok, respectivamente, las cuales también fueron aisladas en el citado centro veterinario y donadas al Instituto Finlay. Todas las cepas fueron conservadas en medio semisólido de Fletcher, a 30 °C y mantenidas en medio líquido EMJH bajo condiciones estáticas a 30 °C. La virulencia fue mantenida a través de pases periódicos en hámsters, realizados según los métodos descritos (2).

#### **Obtención de plasma humano**

Como fuente de fibronectina soluble se utilizaron bolsas de plasma humano fresco, procedentes de la Planta de Hemoderivados “Adalberto Pesant González”, de Ciudad de La Habana, conservadas a -20 °C hasta su uso. La fibronectina se purificó en nuestro laboratorio según el método descrito por Poulouin y colaboradores (9).

#### **Anticuerpos policlonales**

Se emplearon sueros hiperinmunes específicos contra cada uno de los tres serovares de interés de *Leptospira*, obtenidos a partir de ratas Sprague Dawley infectadas experimentalmente. Se emplearon animales adultos de 5-6 semanas de nacidos con un peso de 110-125 g. Las ratas de los serovares Canicola, Copenhageni y Mozdok, altamente virulentas, fueron inoculadas individualmente por vía intraperitoneal con  $2 \times 10^9$  UFC/mL. A los 28 días postinoculación, los animales fueron sangrados por vía femoral y se conservó el suero a -20 °C hasta su uso. Se utilizó, además, una mezcla de sueros de humanos convalecientes de leptospirosis, procedentes del Centro Provincial de Higiene y Epidemiología (CPHE) de la provincia de Holguín, Cuba.

Se obtuvo una muestra de anticuerpos contra albúmina de suero bovino (anti-BSA) a partir de la inoculación de conejos F1 (Nueva Zelanda) con tres dosis de un 1 mg de albúmina de suero bovino (BSA) con adyuvante de Freund, por vía subcutánea, espaciadas cada 14 días. Los anticuerpos se purificaron en una columna de BSA-Sepharose (capacidad de 1,38 mg BSA/mL gel) con un sistema de fijación-elución de 0,02 M Tris HCl 0,9% NaCl pH 7,4 y solución de 0,2 M glicina 1 M NaCl pH 3. La pureza se determinó por SDS-PAGE (12,5%) con previo tratamiento de las fracciones eluidas.

Los animales utilizados fueron suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), de la Ciudad de La Habana, Cuba, con sus correspondientes certificados de salud. Estos fueron mantenidos antes y durante los ensayos siguiendo las instrucciones que aparecen en la *Guía para el cuidado y uso de animales de experimentación* (10). El protocolo de experimento y las condiciones de los animales fueron

sometidos a la Comisión de Ética de la Dirección de Modelos Animales del Instituto Finlay.

#### **Inmovilización de IgG-Anti BSA en Sepharose 2B CL**

La inmovilización de IgG-anti BSA en Sepharose 2B CL (Pharmacia, Suecia), se realizó según lo recomendado por Delfin y col (11). Se preparó una columna cromatográfica de IgG- Anti BSA- Sepharose 2B CL (16 x 175 mm).

#### **Inmovilización en Sepharose 4B CNBr de fibronectina y colágeno tipo I**

La inmovilización de los ligandos fibronectina y colágeno tipo I (Sigma, E.U.A) en Sepharose 4B CNBr (Pharmacia, Suecia), se realizó según lo recomendado por Delfin y col. (11). Se prepararon columnas cromatográficas de fibronectina-Sepharose (16 x 100 mm) y de colágeno tipo I-Sepharose 4B CNBr (16 x 15 mm).

#### **Extracción de proteínas de membrana externa de *L. interrogans***

La extracción de las proteínas de membrana externa (PME) de *L. interrogans* serovar Canicola se realizó mediante tratamiento con Tritón X-114 según el procedimiento descrito por Haake y col. (12). La cepa 87, altamente virulenta, fue cultivada en medio EMJH bajo condiciones controladas (130 rpm, 30 °C) hasta finales de la fase exponencial (6 días). Las células fueron colectadas mediante centrifugación ( $17\ 000 \times g$ , 15 min, 4 °C), lavadas dos veces con solución tampón fosfato salino pH 7.4 (TFS) y finalmente resuspendidas en solución de extracción (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,5% Tritón X-114, 0,25 mM PMSF) hasta  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL. Las células así tratadas se incubaron toda la noche a 4 °C con agitación lenta y luego centrifugadas ( $17\ 000 \times g$ , 15 min, 4 °C). La eficiencia de la extracción fue evaluada por SDS-PAGE al 12,5%. El sobrenadante obtenido fue mezclado con igual volumen de solución de extracción sin Tritón X-114, a fin de disminuir la concentración de detergente de la muestra hasta 0,25% antes de su aplicación a la columna de afinidad IgG anti BSA- Sepharosa 2B CL.

#### **Cromatografía en IgG Anti BSA-Sepharosa 2B CL**

La columna fue equilibrada con solución 0,02 mM Tris HCl 0,9% NaCl pH 7,4. Fueron aplicados 120 mL de un extracto de PME de *L. interrogans* serovar Canicola, utilizando una velocidad de flujo volumétrico de 0,8 mL/min. Se realizó un lavado con tres volúmenes de columna de la solución 0,02 M Tris HCl 0,9% NaCl pH 7,4, posteriormente se eluyó con solución 0,02 M Tris HCl 300 mM glicina 1 M NaCl pH 3. Las etapas de lavado y elución se realizaron con una velocidad de flujo de 1 mL/min. Se colectó la fracción previa a la elución para continuar a partir de ella el proceso de purificación, tanto de proteínas de unión a fibronectina como de proteínas de unión a colágeno.

### **Cromatografía en fibronectina-Sepharosa 4B CNBr**

La fracción colectada de la cromatografía en columna IgG anti BSA-Sepharosa 2B CL (150 mL) fue dializada con la solución de lavado 0,02 M Tris HCl 0,9% NaCl pH 7,4 y aplicada posteriormente en la columna fibronectina-Sepharosa 4B CNBr, utilizando una velocidad de flujo volumétrico de 0,8 mL/min. Se realizó un lavado con tres volúmenes de columna de la solución de lavado. Se eluyó con solución 0,02 M Tris HCl 300 mM glicina-1 M NaCl pH 3. Las etapas de lavado y elución se realizaron a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Se colectó la fracción de elución y se analizó por SDS-PAGE al 12,5%.

### **Cromatografía en colágeno tipo I-Sepharosa 4B CNBr**

Paralelamente al proceso antes descrito para la purificación de proteínas de unión a fibronectina de *L. interrogans*, se llevó a cabo el mismo procedimiento para la obtención de proteínas de unión a colágeno. El volumen correspondiente a la fracción no fijada a la matriz de afinidad IgG Anti BSA-Sepharosa 2B CL (150 mL) fue aplicado en la columna de colágeno tipo I-Sepharosa 4B CNBr, utilizando las mismas condiciones de velocidad de flujo volumétrico y soluciones de lavado y elución que en la cromatografía en fibronectina-Sepharosa 4B CNBr. Se colectó la fracción de elución y se analizó por SDS-PAGE 12,5%.

### **Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

El análisis mediante SDS-PAGE se realizó en un equipo Phast System (Pharmacia, Suecia) con el empleo de geles separadores de acrilamida al 12,5%. Se aplicaron 4 µL de muestras tratadas previamente con una solución de 100 mM Tris HCl pH 6,8-1% β-mercaptoetanol 2% SDS 0,1% glicerol 0,1% bromofenol azul y calentadas a 100 °C, durante 5 min. Tras la separación de las proteínas los geles fueron teñidos con azul Coomassie o nitrato de plata y evaluados mediante un analizador de imágenes [ImageMaster VDS (Amersham, E.U.A.)].

### **Dot blot**

Muestras de 40 µL de la fracción correspondiente a la elución de la columna fibronectina-Sepharosa 4B CNBr y 20 µL de extracto de PME de *L. interrogans* serovar Canicola, fueron aplicadas en cuatro tiras de nitrocelulosa (BioRad, E.U.A.). Para la detección antigénica, las tiras de nitrocelulosa fueron bloqueadas con TFS-3% leche descremada e incubadas individualmente durante 2 h a 37 °C con una mezcla de sueros de humanos convalecientes de leptospirosis, suero de ratas infectadas experimentalmente con los serovares Canicola, Copenhageni y Mozdok, todos diluidos 1:50 en TFS 1,5% leche descremada 0,1% Tween 20. Para la visualización se incubó 1 h con conjugados anti-IgG de rata-peroxidasa (Sigma, E.U.A.) o anti-IgG humana-peroxidasa (Sigma, E.U.A.) diluidos 1:1000 en TFS-1,5%

leche descremada. Se reveló con diaminobenzidina (DAB)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

El mismo procedimiento fue realizado con 40 µL de las fracciones correspondientes a la elución de dos purificaciones en la columna colágeno tipo I-Sepharosa 4B CNBr, 20 µL de extracto de PME de *L. interrogans* serovar canicola, 20 µL de una solución de colágeno tipo I (1 mg/mL) y 20 µL de una solución de BSA (1 mg/mL). La tira de nitrocelulosa fue incubada bajo las mismas condiciones con una mezcla de sueros de humanos convalecientes de leptospirosis diluida 1:50 en TFS 1,5% leche descremada 0,1% Tween 20 y posteriormente con conjugado anti-IgG humana-peroxidasa (Sigma, E.U.A.) diluido 1:1000 en TFS 1,5% leche descremada. Se reveló con diaminobenzidina (DAB)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **Determinación de la cantidad de proteína**

La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante el método de Lowry (13).

## **Resultados y Discusión**

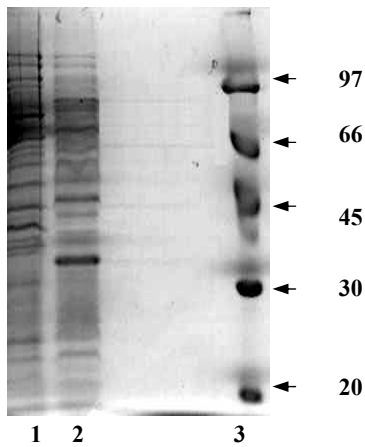
### **Extracción de PME de *L. interrogans***

El método de extracción de proteínas PME de la cepa 87 de *L. interrogans* serovar Canicola, permitió la solubilización de las mismas, según análisis mediante SDS-PAGE 12,5% y tinción con azul de Coomassie (Figura 1).

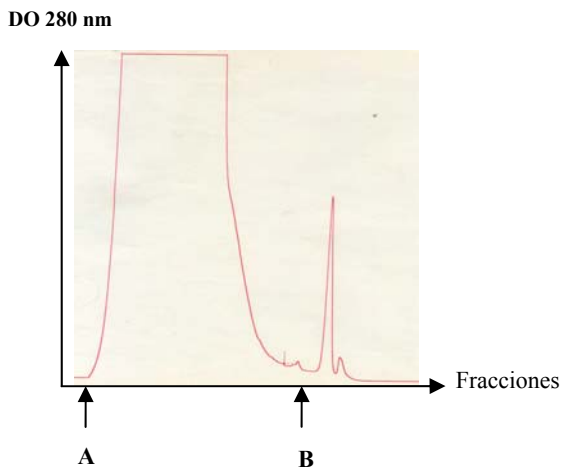
En la Figura 1 se observan bandas de proteínas que coinciden con el perfil electroforético reportado para las PME de este microorganismo (14). El uso del Tritón X-114 permitió una extracción diferenciada de las proteínas presentes en la envoltura celular bacteriana (Figura 1), tal es el caso de la banda mayoritaria de 32 kDa, correspondiente a la lipoproteína LipL32, PME de mayor expresión en cepas patógenas de este microorganismo (15).

### **Procesos cromatográficos y análisis electroforético**

Tras la aplicación del extracto de proteínas a la columna IgG Anti BSA-Sepharosa 2B CL se observó el perfil cromatográfico representado en la Figura 2. Esta primera etapa en el proceso de purificación, común tanto para la obtención de proteínas de unión a fibronectina como para proteínas de unión a colágeno, es necesaria partiendo del criterio de que el medio de cultivo EMJH para *L. interrogans* presenta un alto contenido de BSA (10 mg/mL), de manera que el proceso de lavado de las células puede no ser eficiente para la total eliminación de trazas contaminantes de BSA que puedan interferir en el proceso de purificación. Esto fue comprobado tras la obtención de una segunda fracción en dicho proceso cromatográfico, con una cantidad de proteína de 7,2 mg, contenido que resulta inferior a la capacidad de unión de la columna, lo que se traduce en una primera fracción libre de trazas de BSA.



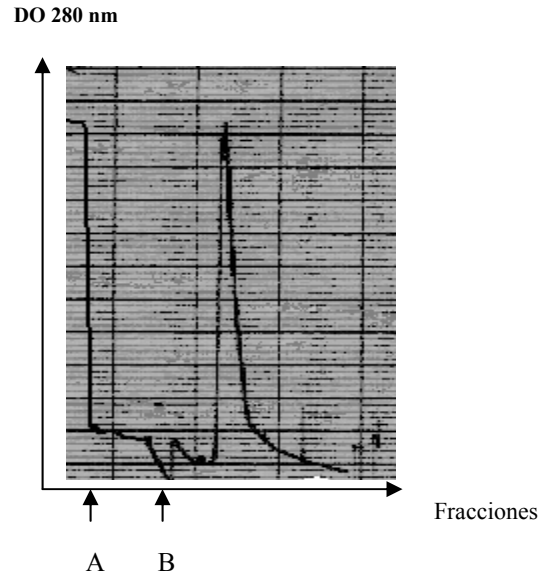
**Figura 1.** Análisis mediante SDS-PAGE (gel separador 12,5%) y tinción con azul Coomassie de PME de la cepa 87 de *L. interrogans* serovar Canicola, extraídas mediante solubilización con Tritón X-114. 1: Proteínas de la fracción citoplasmática. 2: Proteínas de membrana externa. 3: Patrón de peso molecular en kDa.



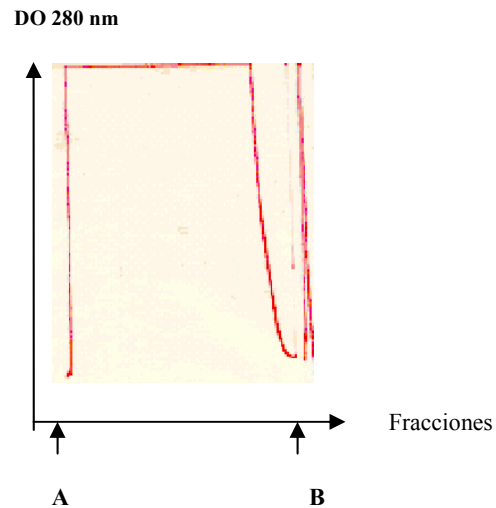
**Figura 2.** Perfil cromatográfico en IgG AntiBSA- Sepharosa 2B CL. (A) Aplicación y lavado: 20 mM Tris HCl-0,9% NaCl pH 7,4. (B) Elución: 20 mM Tris HCl-300 mM glicina-1 M NaCl pH 3. Velocidad de flujo volumétrico: 0,8 mL/min (aplicación) y 1mL/min (lavado y elución). Velocidad del papel: 0,5 mm/min. Rango de absorbancia: 1.Volumen de aplicación: 120 mL.

Esta última fracción fue dializada contra la solución de lavado y se aplicó a las columnas de fibronectina-Sepharosa 4B CNBr (0,98 mg de fibronectina/mL de gel) y colágeno tipo I-Sepharosa 4B CNBr (1,49 mg de colágeno/mL de gel), posteriormente se eluyó con la solución 0,02 M Tris HCl 300 mM glicina 1 M NaCl pH 3, y se observaron los perfiles cromatográficos representados en las Figuras 3 y 4, respectivamente. El análisis mediante SDS-PAGE 12,5% de las fracciones de elución obtenidas en ambos procesos cromatográficos evidenció la presencia de una banda con un tamaño molecular de aproximadamente 40 kDa (Figura 5), para el caso de la cromatografía en fibronectina-Sepharosa

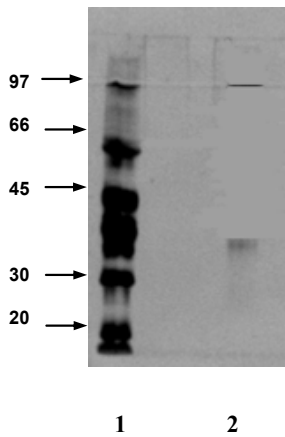
4B CNBr, la cual difiere ligeramente de una proteína de unión a fibronectina de 36 kDa, descrita en el serovar *Icterohaemorrhagiae* (16) y una banda de aproximadamente 25 kDa (Figura 6) presente en la fracción de elución de la cromatografía en colágeno tipo I-Sepharosa 4B CNBr, no reportada con anterioridad.



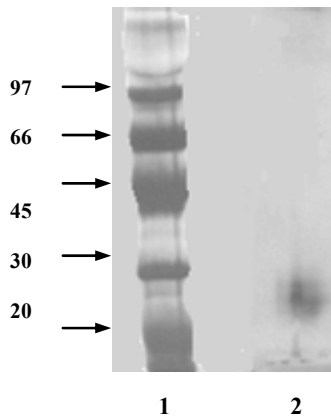
**Figura 3.** Perfil cromatográfico en fibronectina-Sepharosa 4B CNBr. (A) Aplicación y lavado: 20 mM Tris HCl-0,9% NaCl pH 7,4. (B) Elución: 20 mM Tris HCl-300mM glicina-1M NaCl pH 3. Velocidad de flujo volumétrico: 0,8 mL/min (aplicación) y 1 mL/min (lavado y elución). Velocidad del papel: 0,5 mm/min. Rango de absorbancia: 1.Volumen de aplicación: 150 mL.



**Figura 4.** Perfil cromatográfico en colágeno- Sepharosa 4B CNBr. (A) Aplicación y lavado: 20 mM Tris HCl-0,9% NaCl pH 7,4. (B) Elución: 20 mM Tris HCl-300 mM glicina-1M NaCl pH 3. Velocidad de flujo volumétrico: 0,8 mL/min (aplicación) y 1 mL/min (lavado y elución). Velocidad del papel: 0,5 mm/min. Rango de absorbancia: 1.Volumen de aplicación: 150 mL.



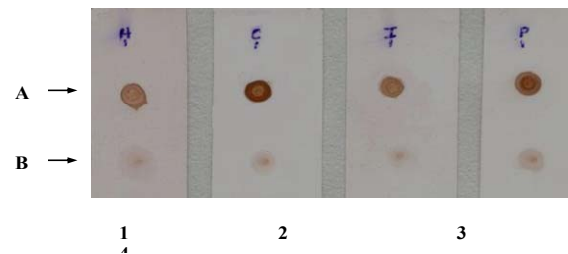
**Figura 5.** Análisis mediante SDS-PAGE (gel separador 12,5 %) y tinción con plata, de la fracción cromatográfica procedente de fibronectina-Sepharosa 4B CNBr. 1: Patrón de peso molecular en kDa. 2: Fracción eluida con la solución 20 mM Tris HCl -1M NaCl-300 mM Glicina pH3.



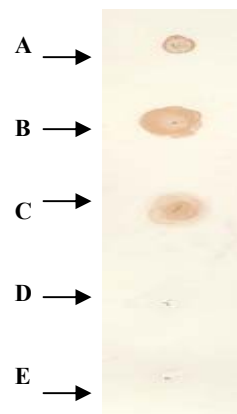
**Figura 6.** Análisis mediante SDS-PAGE (gel separador 12,5 %) y tinción con plata, de la fracción cromatográfica procedente de colágeno-Sepharosa 4B CNBr. 1: Patrón de peso molecular en kDa. 2: Fracción eluida con la solución 20 mM Tris HCl -1M NaCl-300 mM Glicina pH3.

A fin de comprobar la presencia de proteínas de *Leptospira* en las muestras eluidas de ambos procesos de purificación, se llevó a cabo un análisis de las mismas mediante Dot blot frente en sueros de animales o humanos convalecientes de leptospirosis, teniendo en cuenta que las proteínas de unión a fibronectina y a colágeno constituyen factores de virulencia expresados durante la infección *in vivo* (17), que al igual que otras potenciales adhesinas su expresión pudiera disminuir con la atenuación de la virulencia de la cepa (14, 15) o perderse durante el tratamiento con agentes físicos o químicos empleados en la preparación de antígenos vacunales (18). Para el caso de la fracción que proviene de la columna de fibronectina- Sepharosa 4B CNBr, se apreció un reconocimiento de dicha muestra tanto por el suero de

humanos convalecientes de la enfermedad, como por el suero de animales infectados experimentalmente con los serovares Canicola, Copenhageni y Mozdok (Figura 7). Estos resultados confirman no solo la presencia de proteínas del microorganismo en la muestra eluida, sino además que las mismas son antigénicas frente a sueros de convalecientes y conservadas en tres de los serovares de mayor circulación en humanos en Cuba. La fracción de elución de la columna de colágeno tipo I-Sepharosa 4B CNBr fue evaluada contra una mezcla de sueros de humanos convalecientes de leptospirosis, donde se evidenció, igualmente, un reconocimiento de esta y del extracto de PME del cual ella se deriva, así como una falta de interacción entre los anticuerpos presentes en dicho suero y el colágeno tipo I y la BSA aplicados en la nitrocelulosa (Figura 8), lo que confirmó su identidad como una proteína de *Leptospira*, además de su antigenicidad.



**Figura 7.** Reconocimiento mediante Dot blot del extracto de PME de *L. interrogans* serovar Canicola (A) y fracción eluida de Fibronectina-Sepharosa 4B CNBr (B) por suero de humanos y animales convalecientes de leptospirosis. 1: Mezcla de sueros de humanos convalecientes de leptospirosis. 2: Suero de ratas infectadas experimentalmente con *L. interrogans* serovar Canicola. 3: Suero de ratas infectadas experimentalmente con *L. interrogans* serovar copenhageni. 4: Suero de ratas infectadas experimentalmente con *L. interrogans* serovar Mozdok



**Figura 8.** Reconocimiento mediante Dot Blot del extracto de PME de *L. interrogans* serovar Canicola (A), de la fracción eluida de colágeno-Sepharosa 4B CNBr (B y C), solución de colágeno (1 mg/mL) (D) y solución de BSA (1mg/mL) (E) por una mezcla de sueros de humanos convalecientes de leptospirosis.

Las fracciones de elución procedentes de ambos procesos cromatográficos fueron enfrentados contra sueros no inmunes de ratas, los resultados no se muestran debido a que no se evidenció reconocimiento en ninguna de las fracciones evaluadas.

El proceso de purificación desarrollado permitió la purificación de una proteína de unión a fibronectina presente en *L. interrogans* serovar *Canicola* de aproximadamente 40 kDa, así como la obtención de una proteína de unión a colágeno de aproximadamente 25 kDa, las cuales fueron reconocidas por sueros de ratas infectadas experimentalmente o suero de humanos convalecientes de leptospirosis.

La confirmación de la función adhesina de las proteínas de *Leptospira* purificadas mediante cromatografía de afinidad con fibronectina humana y colágeno tipo I, pudiera realizarse mediante estudios de inhibición de la adherencia *in vitro*, empleando células endoteliales. La purificación y caracterización de adhesinas de unión a fibronectina y colágeno en *L. interrogans*, inmunogénicas en convalecientes y altamente conservadas entre serovares patógenos, podría ser un importante paso de avance en la obtención de una formulación vacunal antileptospirosis de nueva generación, capaz de conferir una protección de amplio espectro.

## Referencias

1. Levett PN. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 2001; 14(2):296-326.
2. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. Second Ed. Melbourne: MediSci; 1999.
3. Rodríguez I, Obregón A, Rodríguez J, Fernández C, Arzola A, Victoria B. Caracterización serológica de cepas aisladas de pacientes con leptospirosis humana en Cuba. Rev. Cubana Hig. Epidemiol 2002; 40:11-5.
4. Wizemann TM, Adamou JE, Langermann S. Adhesins as targets for vaccine development. Emerg. Inf. Dis. 1999; 5:395-403.
5. Haake DA, Mazel MK, McCoy AM, Milward F, Chao G, Matzuna J, et al. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. Infect. Immun. 1999; 67:6572-6582.
6. Koizumi N, Watanabe H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. Vaccine 2004; 22:1545-1552.
7. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. Annu. Rev. Microbiol 1994; 48:585-617.
8. Joh D, Wann ER, Kreikemeyer B, Speziale P, Hook M. Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. Matrix Biol. 1999; 18:211-223.
9. Poulouin L, Gallet O, Rouahi M, Imhoff J-M. Plasma fibronectin: three steps to purification and stability. Protein. Express. Purific 1999; 17:146-152.
10. Olfert ED, Cross BM, Mc William AA. Guide to the care and use of experimental animals. Vol.1. 2<sup>nd</sup> ed. Canadian Council on Animal Care; 1993.
11. Delfin J, Martínez I, Antuch W, Morera V, González Y, Rodríguez R, et al. Purification, characterization and immobilization of proteinases inhibitor from *Stichodactyla helianthus*. Toxicon 1996; 34. (11):1367-1376.
12. Haake DA, Walker EM, Blanco DR, Bolin CA, Miller JN, Lovett MA. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar Grippityphosa during in vitro cultivation. Infect. Immun 1991; 59 (3):131-1140.
13. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. A protein measurement with the folin-phenol reagent. Biol. Chem 1951; 193:265-275.
14. Cullen PA, Cordwell SJ, Bulach DM, Haake DA, Adler B. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. Infect. Immun. 2002; 70:2311-2318.
15. Haake DA, Chao RL, Zuerner JK, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. Infect. Immun. 2000; 68:276-2285.
16. Merien F, Truccolo J, Baranton G, Perolat P. Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. FEMS Microbiol. Lett. 2000; 185(1):17-22.
17. Thomas DD, Higbie LM. In vitro association of leptospires with host cells. Infect. Immun. 1990; 58:581-585.
18. Vinetz JM. Leptospirosis. Curr. Op. Inf. Dis. 2001; 14:527-538.

## Detection of fibronectin and collagen binding-proteins from *Leptospira interrogans* serovar *Canicola*

### Abstract

As part of the studies conducted to obtain a vaccine formulation by subunits against human leptospirosis, purification and characterization of fibronectin and collagen binding-proteins in *Leptospira interrogans* was developed. Outer membrane proteins from *Leptospira* were solubilized with Triton X-114 and were applied in a first step into an IgG AntiBSA- Sepharose 2B CL affinity chromatographic column to eliminate BSA as main contaminant of culture media for this microorganism. The BSA free fraction was applied into a Fibronectin-Sepharose 4B CNBr affinity column. A fibronectin binding protein from *Leptospira interrogans* serovar *Canicola* strain 87, with a molecular weight of 40 kDa was obtained. For this, specific sera obtained from experimentally infected rats with each serovar and mixes of human sera of convalescent patients were used. This protein showed to be antigenic and conserved in *Canicola*, *Copenhageni* and *Mozdok* serovars. Solubilized outer membrane protein by Triton X114 was applied into another affinity column of Collagen-Sepharose 4B CNBr to isolate collagen binding proteins from *Leptospira interrogans* serovar *Canicola* strain 87. A collagen binding protein with a molecular weight of 25 kDa which showed to be antigenic when evaluated by Dot-Blot against human sera of convalescent patients was found.

**Keywords:** *Leptospira*, collagen, fibronectin, affinity chromatography.

Recibido: Noviembre de 2007

Aprobado: Diciembre de 2007