

## Caracterização das proteínas de superfície de membrana externa da sorovariedade Hardjo isolada de bovinos em Minas Gerais<sup>1</sup>

Rogério O. Rodrigues<sup>2,3\*</sup>, José A. Silva<sup>2</sup>, Telma M. Alves<sup>2</sup>, Elaine M.S. Dorneles<sup>2</sup>, Sílvia Minharro<sup>2,4</sup>, Andrey P. Lage<sup>2</sup>, Rômulo C. Leite<sup>2</sup> e Élvio C. Moreira<sup>2</sup>

**ABSTRACT.** - Rodrigues R.O., Silva J.A., Alves T.M., Dorneles E.M.S., Minharro S., Lage A.P., Leite R.C. & Moreira E.C. 2011. [**Characterization of outer membrane proteins of serovar Hardjo isolated from cattle in Minas Gerais, Brazil.**] Caracterização das proteínas de superfície de membrana externa da sorovariedade Hardjo isolada de bovinos em Minas Gerais. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31(7):555-560. Universidade Vale do Rio Doce, Campus Antônio Rodrigues Coelho, Rua Israel Pinheiro 2000, Bairro Universitário, Cx. Postal 295, Governador Valadares, MG 35020-220, Brazil. E-mail: [rogerrodriguesvet@gmail.com](mailto:rogerrodriguesvet@gmail.com)

Differences in the protein profile of *Leptospira* sp. strains Sponselee, Norma and Hardjoprajitno were observed, with bands ranging from 175.47 kDa to 12.10 kDa. Strain Sponselee presented a 12-band profile, while strain Norma showed 11 and strain Hardjoprajitno showed 9 bands in the profile. All bands observed in Sponselee strain profile could match bands in the other two strains. Strain Norma lacks a band at 35.77 kDa and strain Hardjoprajitno lacks the bands at 89.59 kDa, 35.77 kDa and 12.10 kDa. The recognition profile from hyperimmune sera was also different for the studied serovar Hadjo strains. The majority of recognized proteins was in the range of 35.83 kDa to 29.19 kDa. Cattle sera against strain Norma only recognized low molecular mass proteins in strains Norma (6.80 kDa) and Hardjoprajitno (6.80 kDa and 5.30 kDa). Bovine sera against strain Hardjoprajitno recognized a 44.33 kDa protein in all studied strains and proteins of 4.22 kDa in strains Sponselee and Norma and of 10.49 kDa and 6.16 kDa in strain Hadjoprajitno. The different identified proteins could become specific targets to the development of diagnostic tests and vaccines against bovine leptospirosis.

INDEX TERMS: *Leptospira* serovar Hardjo, Minas Gerais State, Brazil, protein profile, cattle.

**RESUMO.-** Foram identificadas diferenças no perfil protéico das amostras de Sponselee, Norma e Hardjoprajitno, com bandas protéicas entre 175, 47 kDa e 12,10 kDa. A amostra Sponselee foi a que apresentou maior número de bandas (12), seguida da Norma que apresentou 11 bandas e de Hardjoprajitno que apresentou 9 bandas. Todas as bandas observadas na amostra Sponselee possuíam correspondentes nas outras duas amostras. A amostra Norma não apresentou uma banda em torno de 35,77 kDa e a Hardjoprajitno não apresentou ban-

das em torno de 89,59 kDa, 35,77 kDa e 12,10 kDa. O reconhecimento dessas proteínas por soros hiperimunes contra cada uma das amostras também mostrou diferenças, sendo que o maior número de proteínas reconhecido em todas as amostras por todos os soros se encontrou entre 35,83 kDa e 29,19 kDa. Os soros contra bovino na amostra Norma só reconheceu proteínas de baixa massa molecular nas amostras Norma (6,80 kDa) e Hardjoprajitno (6,80 kDa e 5,30 kDa). Soro bovino contra a amostra Hardjoprajitno reconheceu uma proteína de 44,33 kDa todas às amostras e proteínas de 4,22 kDa nas amostras Sponselee e Norma e de 10,49 kDa e 6,16 kDa na Hardjoprajitno. As diferentes proteínas identificadas poderiam se constituir em alvos específicos para o desenvolvimento de testes diagnósticos e vacinas contra leptospirose bovina.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Leptospira* sorovar Hardjo, Minas Gerais, perfil protéico, bovino.

### INTRODUÇÃO

Leptospirose é uma doença aguda, febril e septicêmica causada por espécies de espiroquetas de leptospiras. Leptospiras

<sup>1</sup> Recebido em 1 de fevereiro de 2011.

Aceito para publicação em 1 de março de 2011.

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos 6627, Cx. Postal 567, Belo Horizonte, MG 30123-970, Brasil

<sup>3</sup> Universidade Vale do Rio Doce (Univale), Campus Antônio Rodrigues Coelho, Rua Israel Pinheiro 2000, Bairro Universitário, Cx. Postal 295, Governador Valadares, MG 35020-220, Brasil. \*Autor para correspondência: [rogerrodriguesvet@gmail.com](mailto:rogerrodriguesvet@gmail.com)

<sup>4</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Tocantins, Rua Paraguai s/n (esquina com Urixamas), Setor Cimba, Araguaína, TO 77838-824, Brasil

patogênicas tem um amplo espectro de hospedeiros e são ubi-quitárias, entretanto não são distinguíveis nas bases morfológicas, bioquímicas e em métodos usuais de cultivo, estes organismos tem propriedades antigênicas distintas como demonstrado pela aglutinação e testes de absorção-aglutinação.

Ellis (1984) analisou especificamente a prevalência, patogênese e controle da leptospirose bovina em países tropicais. Desta forma, o autor dividiu a ocorrência de diferentes sorovariedades de *Leptospira* em dois grandes grupos: o de amostras adaptadas e mantidas pelo gado bovino, como Hardjo que dependem de região e do índice pluviométrico; e as infecções acidentais, determinadas por amostras mantidas por outras espécies domésticas ou silvestres. Nos bovinos, do Brasil, as pesquisas indicam que a sorovariedade Hardjo é mais freqüentemente detectada e a que causa maior impacto econômico na eficiência reprodutiva de rebanhos de bovinos de diversas partes do mundo (Moreira 1994).

Diversas sorovariedades de *Leptospira* sp. foram isoladas de bovinos no Brasil, entretanto, a sorovariedade Hardjo tem sido encontrada sorologicamente com maior freqüência e causando maior impacto na eficiência reprodutiva de rebanhos bovinos (Vasconcellos et al. 1997).

Vários estudos tem sido conduzidos no Brasil, Leite (2000) encontrou a sorovariedade Hardjo como a mais prevalente e amplamente disseminada em bovinos no Estado da Paraíba, e uma baixa prevalência de muitas outras sorovariedades como Canicola, Grippothyphosa, Hebdomadis, Pyrogenes, Tarassovi e Wolffi, já detectadas em baixas frequências em outros estudos em bovinos no Brasil (Guida et al. 1959, Santa Rosa et al. 1961, Moreira et al. 1979, Giorgi et al. 1981) estes resultados confirmam os bovinos como reservatórios usuais da sorovariedade Hardjo e que sua alta prevalência pode interferir com a produção bovina (Prescott et al. 1993, Faine et al. 1999, Leite et al. 2000).

Grandes diferenças nos resultados entre as duas amostras da sorovariedade Hardjo utilizadas no laboratório de zoonoses da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais têm sido observadas e a amostra Norma é a que tem detectado o maior número de animais (Moreira 2010). Estas diferenças entre as estirpes Norma e Hardjoprajtino da sorovariedade Hardjo, já haviam sido observadas antes, com maior ou menor intensidade, em outras populações de bovinos e ovinos em outros estados do Brasil (Moreira 1994, Hermann 2004).

A amostra Norma foi isolada no Estado de Minas Gerais, Brasil da urina de um bovino (Moreira 1994) e foi identificada como *L. interrogans* sorovariedade Hardjo, tipo Hardjoprajtino (Korver, comunicação pessoal) que utilizou anticorpos monoclonais (Terpstra et al., 1985). Estas diferenças encontradas são provavelmente devido ao baixo número de passagens e origem da amostra Norma, tendo sido isolada em 1991, a amostra Norma tem um menor número de passagens "in-vitro" que a amostra Hardjoprajtino que foi isolada em 1938 (Wolf, 1969). Assim sendo, como a amostra Norma foi isolada no Brasil, ela provavelmente apresenta maior similaridade antigênica com *L. interrogans* sorovariedade Hardjo, que infecta bovinos no Brasil, do que a estirpe Hardjoprajtino isolada de um homem em Sumatra (Wolf 1969). Fontanals et al. (2001) estudando diferentes isolados

de *L. interrogans* sorovariedade Pomona de bovinos encontraram resultados similares, sugerindo que um isolado local da sorovariedade Hardjo pode ser mais sensível na detecção de animais da localidade que estiverem infectados.

As leptospiroses são usualmente controladas por vacinação, recentes estudos têm demonstrado a falta de uma proteção completa com a sorovariedade Hardjo e entre sorovariedades da espécie *L. borgpetersenii*, devido às vacinas usualmente consistirem de células inteiras quimicamente inativadas, virtualmente pouco se conhece sobre os componentes imunogênicos responsáveis por provocar a resposta imune protetora (Nunes-Edwards 1985).

A natureza das bases moleculares da patogenicidade de leptospiroses é pouco elucidada, entretanto anticorpos que se aderem aos LPS da membrana conferem considerável grau de proteção que possuem atividade endotóxica comuns em bactérias Gram-negativas, além de algumas sorovariedades produzirem uma hemolisina com atividade de esfingomielisina sendo outros fatores de virulência ainda não descritos (Haake et al. 1991).

A membrana externa de *Leptospiras* spp. é uma estrutura label e facilmente danificada por traumas mecânicos ou tratamentos químicos. As técnicas usadas para identificar proteínas da membrana externa em bactérias Gram-negativas não têm sido adequadamente utilizadas devido à fragilidade estrutural das espiroquetas, tal como *Treponema pallidum* (Cunningham et al. 1988). Diferenças ultra-estruturais e antigênicas na identidade das moléculas de superfície de amostras virulentas e cultivos isogênicos de culturas atenuadas de *L. interrogans* da sorovariedade Grippothyphosa têm sido demonstradas (Haake et al. 1991).

Existem 239 sorovariedades entre as leptospiroses patogênicas, as variações na composição do carboidrato do LPS refletem a diversidade antigênica das leptospiroses. Tem sido demonstrado que o LPS é um imunógeno protetor que é geralmente sorovariedade específico (Faine et al. 1999). Ao contrário dos LPS, extratos protéicos preparados de uma leptospira patogênica podem induzir imunidade protetora contra o desafio com a sorovariedade heteróloga em um modelo animal experimental (Sonrier et al. 2000). Estes resultados sugerem que as proteínas de leptospiroses podem ser candidatas para uma nova vacina que induza efetiva proteção contra diversas sorovariedades.

Diversas proteínas imunogênicas têm sido testadas como imunógenos anti-leptospiroses (Shang et al. 1996, Haake et al. 1998, 2000, Guerreiro et al. 2001, Matsunaga et al. 2002, Palaniappan et al. 2002) e muitas proteínas de leptospiroses, tal como OmpL1, LipL41 e Hap1 (também conhecida como LipL32), são encontradas como imunógenos protetores conservados entre as leptospiroses patogênicas (Haake et al. 1999, Branger et al. 2001), a OmpL1 e a LipL41 induziram imunoproteção sinérgica em hamster (Haake et al. 1999). A vacinação mediada por Adenovírus de Hap1 induziu proteção contra o desafio heterólogo em gerbils (Branger et al. 2001), as proteínas (LigA-m e LigB-m) homólogas e imunogênicas de *L. interrogans* sorovariedade Manilae são candidatas a vacinógenos para a prevenção da leptospirose (Koizumi & Watanabe 2004).

A identificação de antígenos protéicos comuns espécie específicos possui considerável valor no entendimento dos me-

canismos patogênicos, pois melhoram testes rápidos de diagnósticos diretos, bem como, os testes sorológicos e também poderão contribuir para a vacinação pelo aumento de proteção cruzada entre sorovariedades específicas de LPS. Por estas razões um grande número de estudos tem investigado proteínas de membrana de superfície em leptospiros patogênicos (Adler et al. 1980, Nunes-Edwards et al. 1985, LeFebvre et al. 1987, Haake et al. 1991, 2000, 2004, Pope & Johnson 1991, Nicholson & Prescott. 1993, De La Peña-Moctezuma et al. 1999, Nally et al. 2001, Cullen et al. 2002, 2003, Haake & Matsunaga 2002, Palaniappan et al. 2002, Matsunaga et al. 2003).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras e condições de cultivo

As amostras utilizadas foram *Leptospira interrogans* sorogrupo Sejroe sorovariedade Hardjo, tipo Hardjoprajitno, estirpe Hardjoprajitno isolada de um humano na Indonésia e *L. borgpetersenii* sorogrupo Sejroe sorovariedade Hardjo, tipo Hardjobovis, estirpe Sponselee isolada de um bovino na Holanda são provenientes do Royal Tropical Institute de Amsterdã, Holanda, em 1979 e do Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis da Organización Panamericana de la salud e Organización Mundial de la Salud, Buenos Aires, Argentina em 1998 respectivamente. *L. interrogans*, sorogrupo Sejroe, sorovariedade Hardjo, tipo Hardjoprajitno, estirpe Norma foi isolada de um rebanho leiteiro no município de Pitangui, Minas Gerais (Moreira 1994). Todas as amostras foram mantidas na Escola de Veterinária da UFMG, no laboratório de Zoonoses da Escola de Veterinária da UFMG e são mantidas em meio Fletcher semi-sólido (Fletcher 1928) com repiques trimestrais.

### Soros

**Soro hiperimune de coelhos.** Foram utilizados quatro coelhos brancos adultos da raça Nova Zelândia onde foram inoculados cultivos de *L. interrogans*, sorogrupo Sejroe, sorovariedade Hardjo, tipo Hardjoprajitno, estirpe Hardjoprajitno, *L. borgpetersenii* sorogrupo Sejroe, sorovariedade Hardjo, tipo Hardjobovis, estirpe Sponselee e *L. interrogans*, sorogrupo Sejroe, sorovariedade Hardjo, tipo Hardjoprajitno, estirpe Norma cultivados com 14 dias ( $2 \times 10^8$  leptospiros/mL) injetados pela via intraperitoneal com um volume de 3mL no dia zero, 6mL no dia 7, 9mL no dia 14 e 12mL no dia 21 (Nicholson & Prescott 1993). Sete dias após a última aplicação foi coletado soro e determinado o título usando amostra viva e homologa através do Teste de Soroaglutinação Microscópica (Cole et al. 1973).

**Soro de bovinos.** Foram utilizados soros de bovinos naturalmente infectados, da coleção do Laboratório de Zoonoses do DMVP, EV-UFMG, que reagiram especificamente com as amostras *L. interrogans*, sorogrupo Sejroe, sorovariedade Hardjo, tipo Hardjoprajitno, estirpe Hardjoprajitno, *L. borgpetersenii* sorogrupo Sejroe, sorovariedade Hardjo, tipo Hardjobovis, estirpe Sponselee e *L. interrogans*, sorogrupo Sejroe, sorovariedade Hardjo, tipo Hardjoprajitno, estirpe Norma no Teste de Soroaglutinação Microscópica.

### Frações ricas em proteínas de membrana externa de *Leptospira* sp.

Os antígenos utilizados foram preparados a partir de todas as amostras cultivadas em EMJH (Ellinghausen & McCullough 1965) a 28°C por 14 dias segundo Barenkamp et al. (1981) e Nicholson & Prescott (1993).

### Dosagem de proteína

As dosagens protéicas foram realizadas segundo o método de Lowry et al. (1951), tendo como padrão a soroalbumina bovina.

### Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e 'immunoblotting'

Para a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi empregada a técnica descrita por Laemmli (1970). O 'immunoblotting' foi realizado segundo Bjerrum & Heegaard (1988) e Coligan et al. (1996), com as frações ricas em proteínas de membrana externa de *Leptospira* sp.

### Análise do perfil protéico das amostras de *Leptospira* sp.

A análise e comparação do perfil protéico das amostras de *Leptospira* sp. isoladas de bovinos em Minas Gerais e de referência foi realizada empregando o "software" BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Bélgica).

## RESULTADOS

Os resultados da análise do perfil protéico das amostras de *Leptospira* sp. testadas são apresentados na Figura 1. Foram identificadas em géis de poliacrilamida várias bandas comuns às três amostras estudadas com massa molecular variando entre 175,47 kDa e 12,10 kDa. A amostra Sponselee foi a que apresentou maior número de bandas (12), seguida da amostra Norma que apresentou 11 bandas e da amostra Hardjoprajitno que apresentou 9 bandas. Todas as bandas observadas na amostra Sponselee possuíam corresponden-

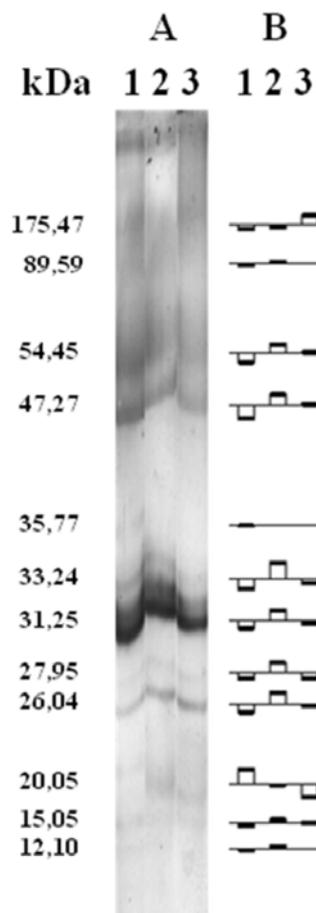


Fig.1. Perfil protéico das amostras de *Leptospira* sp. testadas. (A) Perfil protéico em eletroforese de gel de poliacrilamida a 12% corado pela prata e (B) o esquema do padrão de bandas analisado das amostras de *Leptospira* sp. 1 = Hardjobovis (Sponselee); 2 = Hardjoprajitno (Norma); 3 = Hardjoprajitno (Hardjoprajitno).

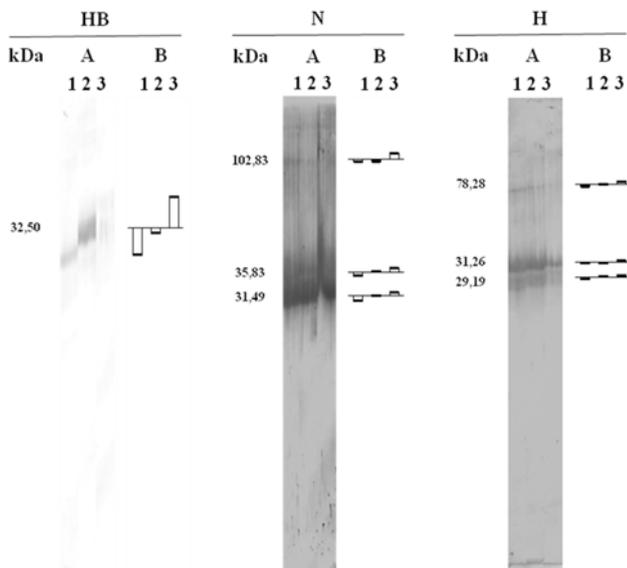


Fig. 2. Western Blotting das amostras de *Leptospira* sp. estudadas com soro hiperimune produzido em coelhos. Extratos protéicos das *Leptospiras* sp., tipo Hardjobovis, estirpe Sponselee (HB), tipo Hardjoprajitno, estirpe Norma (N) e tipo Hardjoprajitno, estirpe Hardjoprajitno (H) foram testados contra cada uma das amostras {1 = Hardjobovis (Sponselee); 2 = Hardjoprajitno (Norma); 3 = Hardjoprajitno (Hardjoprajitno)}. (A) Western Blotting das amostras. (B) Esquema do padrão de bandas analisado.

tes nas outras duas amostras. A amostra Norma não apresentou uma banda em torno de 35,77 kDa e a amostra Hardjo não apresentou bandas em torno de 89,59, 35,77 e 12,10 kDa.

Os soros hiperimunes produzidos em coelhos contra as amostras de *Leptospira* sp Sponselee, Norma e Hardjoprajitno, quando utilizados no western blotting, identificaram padrões de bandas diferentes entre as três amostras estudadas (Fig. 2). Frente ao mesmo soro hiperimune, todas as amostras apresentaram padrão de bandas reconhecidas semelhante. Todos os soros foram capazes de identificar proteínas com massa molecular entre de 35,83 kDa e 29,19 kDa, sendo que o soro hiperimune contra a amostra Sponselee só detectou uma classe de bandas de 32,50 kDa. Nesta faixa de massa molecular, duas classes de bandas foram identificadas pelo soro hiperimune contra as amostras Norma, 35,83 kDa e 31,49 kDa, e Hardjoprajitno, 31,26 kDa e 29,19 kDa. Bandas de alto peso molecular também foram identificadas pelos soros contra as amostras de *Leptospira* sp. Norma (102,83 kDa) e Hardjoprajitno (78,28 kDa).

Na coleção de soros de bovinos reagentes a antígenos de *Leptospira* sp do Laboratório de Zoonoses da Escola de Veterinária da UFMG só foram encontrados soros reagindo especificamente contra as amostra Norma e Hardjoprajitno. Nenhum soro com reação específica somente contra a amostra de *Leptospira borgpeterseni* tipo Hardjobovis estirpe Sponselee foi encontrado.

Os western blotting realizados com os soros de bovinos específicos contra as amostras Norma e Hardjoprajitno são apresentados na Figura 3. O soro bovinos contra a amostra Norma só reconheceu proteínas de baixo peso molecular nas amostras Norma e Hardjoprajitno. Esse reconhecimento foi diferenciado, pois uma banda de 6,80 kDa foi reconhecida

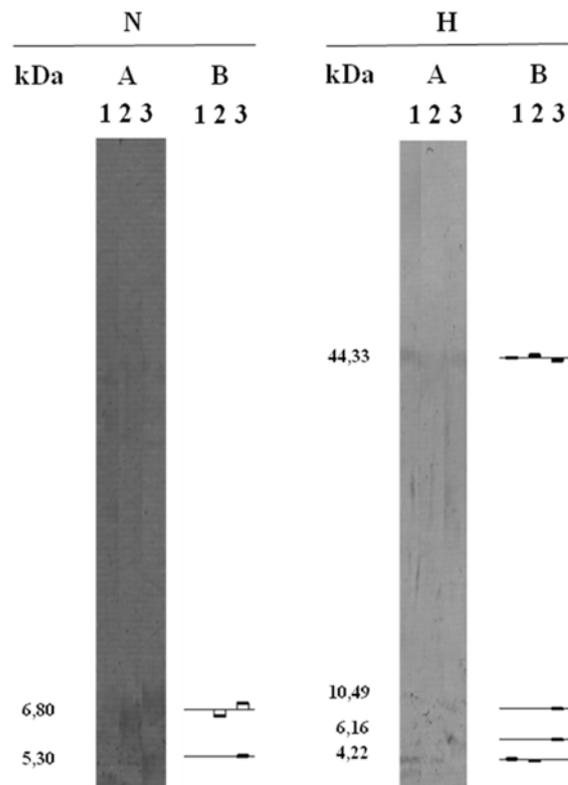


Fig. 3. Western Blotting das amostras de *Leptospira* sp. estudadas com soro de bovinos naturalmente infectados reagindo especificamente contra a amostra Hardjoprajitno (Norma) (N) e a amostra Hardjoprajitno (Hardjoprajitno) (H) de *Leptospira* sp. testadas contra extratos protéicos de cada uma das amostras 1 = Hardjobovis (Sponselee); 2 = Hardjoprajitno (Norma); 3 = Hardjoprajitno (Hardjoprajitno). (A) Western Blotting das amostras. (B) Esquema do padrão de bandas analisado.

nas duas amostras, mas na amostra Hardjoprajitno uma banda extra de 5,30 kDa também foi reconhecida. Nenhuma proteína foi reconhecida por esse soro na amostra Sponselee. Já o soro de bovino contra a amostra Hardjoprajitno reconheceu proteínas de médio e baixo peso molecular. Uma proteína de 44,33 kDa foi reconhecida em todas as amostras por esse soro. Proteínas de 10,49 kDa e 6,16 kDa foram reconhecidas por esse soro na amostra Hardjoprajitno e uma proteína de 4,22 kDa foi reconhecida nas amostras Norma e Sponselee.

## DISCUSSÃO

Diferenças no diagnóstico sorológico de leptospirose pelo teste de soroaglutinação microscópica em função da amostra utilizada no teste já foram descritas (Fontanals et al. 2001, Herrmann et al. 2004, Lage et al. 2007). No Rio Grande do Sul e na Paraíba, Herrmann et al. (2004) e Lage et al. (2007) descreveram maior número de soros de ovinos e bovinos, respectivamente, que eram positivos à sorovariedade Hardjo de *Leptospira interrogans* no teste de soroaglutinação microscópica quando se utilizava a amostra Norma que quando se utilizava a amostra de referência Hardjoprajitno. A amostra Norma foi isolada em Minas Gerais em 1991 (Moreira 1994) e, portanto provavelmente representa melhor as amostras que circulam no Estado. Os resultados encontrados no pre-

sente trabalho podem ajudar a compreender os resultados sorológicos de ovinos e bovinos observados em Minas Gerais, pois neste estudo foram identificadas diferenças no perfil protéico das amostras de *Leptospira* sp Sponselee, Norma e Hardjoprajitno e no seu reconhecimento por soro hiperimunes contra estas amostras ou por soro de bovinos naturalmente infectados.

A amostra Norma, que foi identificada como *L. interrogans* sorovariedade Hardjo (Moreira 1994), portanto da mesma espécie e sorovariedade da amostra de referência da Organização Mundial da Saúde Hardjoprajitno, apresentou maiores similaridades à amostra Sponselee, que mesmo sendo da sorovariedade Hardjo pertence à espécie *L. borgpetersenii*. Esta diferença da amostra Norma em relação à amostra Hardjoprajitno pode ser explicada pelo maior número de passagens desta amostra, que foi isolada em Sumatra em 1938 (Wolff 1969). Por apresentar grandes semelhanças com as duas amostras de referência, Hardjoprajitno e Sponselee, a amostra Norma se apresenta como uma melhor alternativa a ser utilizada no diagnóstico sorológico da leptospirose em bovinos no Estado de Minas Gerais.

O reconhecimento de proteínas de *Leptospira* sp. por soros hiperimunes produzidos em coelhos contra as amostras Sponselee, Norma e Hardjoprajitno também mostraram diferenças, sendo que o maior número de proteínas reconhecido em todas as amostras por todos os soros se encontrou entre 35,83 kDa e 29,19 kDa. Apesar de todos os soros hiperimunes terem apresentado títulos altos (dados não apresentados), o soro anti-Sponselee só reconheceu uma proteína (32,50 kDa) em todas as três amostras, o que pode indicar que mesmo apresentado perfis protéicos semelhantes, as proteínas ou a imunogenicidade das proteínas pode ser diferente entre as amostras. Lafeté et al. (2008), trabalhando com géis bidimensionais e *L. interrogans* sorovariedade Hardjo, mostraram que várias proteínas de mesma massa molecular podem estar presentes membrana externa de *L. interrogans* e que estas proteínas não podem ser resolvidas em géis monodimensionais como os utilizados no presente estudo. As duas classes de proteínas reconhecidas pelos soros anti-Hardjoprajitno e anti-Norma, na faixa de 35,83 kDa a 29,19 kDa, parecem se equivaler, mas ambos os soros reconhecem proteínas de alta massa molecular diferentes em todas as amostras estudadas (78,28 kDa e 102,83 kDa, respectivamente). Estas proteínas de alta massa molecular indicam ser muito imunogênicas, pois apesar de não terem sido observadas nos géis de poliácridamida, foram detectadas pelos anticorpos induzidos pela inoculação dessas amostras em coelhos. Em função destes achados, essas proteínas de alta massa molecular devem ser investigadas por outras técnicas imunológicas para se avaliar seu real valor para o diagnóstico e produção de vacinas contra a leptospirose bovina.

Soros de bovinos naturalmente infectados e reconhecendo especificamente a amostra Norma ou a amostra Hardjoprajitno apresentaram padrões de reconhecimento diferente frente às três amostras estudadas. Soro bovino contra a amostra Norma só reconheceu proteínas de baixo peso molecular nas amostras Norma (6,80 kDa) e Hardjoprajitno (6,80 kDa e 5,30 kDa). Estas proteínas também podem constituir proteínas altamente imunogênicas, pois também não foram de-

tectadas nos géis de poliácridamida. Outra explicação para a ausência dessas proteínas de baixa massa molecular nos géis de poliácridamida seria que o tempo de corrida pode ter sido muito extenso e as amostras saíram do gel, não podendo ser detectadas. Soro bovino contra a amostra Hardjoprajitno reconheceu uma proteína de 44,33 kDa em todas as amostras, o que chama a atenção desta proteína pelo seu potencial diagnóstico ou na produção de vacinas contra leptospirose. As proteínas de baixa massa molecular reconhecidas pelo soro anti-Hardjo nas amostras Sponselee e Norma (4,22 kDa) e na própria amostra Hardjoprajitno (10,49 kDa e 6,16 kDa) também podem ser altamente imunogênicas ou terem saído do gel em função do tempo de corrida do mesmo.

A ausência de reconhecimento da amostra Sponselee pelo soro de bovino naturalmente infectado específico para a amostra Norma, assim como a pouca reatividade do soro anti-Sponselee para as três amostras testadas, pode indicar que a amostra Sponselee seja menos imunogênica que as outras duas amostras da sorovariedade Hardjo estudadas. Esta indicação ainda pode ser corroborada pela ausência de soros com reatividade específica para a amostra Sponselee dentre os milhares de soros do banco de soros do Laboratório de Zoonoses da Escola de Veterinária da UFMG.

Desta forma, o presente estudo permitiu a identificação de proteínas com imunogenicidade diferente entre as amostras Norma, Sponselee e Hardjoprajitno que podem ser utilizadas no desenvolvimento de métodos diagnósticos e vacinas contra a leptospirose bovina.

**Agradecimentos.**- Este estudo contou com o apoio financeiro da Fapemig e da FEP MVZ Coordenação Preventiva. TMA e SM são bolsistas da Capes. EMSD, APL e ECM são bolsistas do CNPq.

## REFERÊNCIAS

- Adler B., Faine S. & Yanagawa R. 1980. Comparative studies on two antigens (F4 and TM) extracted from *leptospire*s. J. Clin. Microbiol. 12(1):7-9.
- Barenkamp S.J., Munson Jr R.S. & Granoff D.M. 1981. Comparison of outer-membrane protein subtypes and biotypes of isolates of *Haemophilus influenzae* type b. J. Infect. Dis. 144(5):480.
- Bjerrum O.J. & Heegaard N.H.H. 1988. Handbook of Immunoblotting of Proteins, Vol.1. CRC Press, Boca Raton, Florida, p.127.
- Branger C., Sonrier C., Chatrenet B., Klonjowski B., Ruvoen-Clouet N., Aubert A., Andre-Fontaine G. & Eloit M. 2001. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. Infect. Immun. 69: 6831-6838.
- Cole J.R., Sulzer C.R. & Pursell A.R. 1973. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. Appl. Microbiol. 25:976-980.
- Coligan J.E., Kruisbeek A.M., Margulies D.H., Shevach E.M. & Strober W. 1996. Current protocols in immunology. John Wiley and Sons, New York.
- Cullen P.A., Cordwell S.J., Bulach D.M., Haake D.A. & Adler B. 2002. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* Serovar Lai. Infect. Immun. 70:2311-2318.
- Cullen P.A., Haake D.A., Bulach D.M., Zuerner R.L. & Adler B. 2003. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. Infect. Immun. 71:2414-2421.
- Cunningham T.M., Walker E.M., Miller J.N. & Lovett M.A. 1988. Selective release of the *Treponema pallidum* outer membrane and associated polypeptides with Triton X-114. J. Bacteriol. 170(12):5789-5796.
- De La Pena-Moctezuma A., Bulach D.M., Kalambaheti T. & Adler B. 1999. Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* subtype Hardjoprajitno and *Lep-*

- Leptospira borgpetersenii* subtype Hardjobovis. FEMS Microbiol. Lett. 177:319-326.
- Ellinghausen H.C. Jr & McCullough W.G. 1965. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: Fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. Am. J. Vet. Res. 26:45-51.
- Ellis W.A. 1984. Bovine leptospirosis in the tropics: Prevalence, pathogenesis and control. Prev. Vet. Med. 2:411-421.
- Faine S., Adler B., Bolin C. & Perolat P. 1999. *Leptospira* and leptospirosis. 2<sup>nd</sup> ed. MediSci, Melbourne. 272p.
- Fletcher W. 1928. Recent work on leptospirosis: Tsutsugamushi disease and tropical typhus in the Federated Malay States. Trans. Roy. Soc. Trop. 21(4):265.
- Fontanals A., Lorenete P., Samaritano L. & Mundo S. 2001. *Leptospira interrogans* serovar pomona: detección de diferencias antigénicas entre tres aislamientos regionales de bovinos y una cepa de referencia. Revta Argent. Microbiol. 33:108-112.
- Giorgi W., Teruya J.M., Silva A.S. & Genovez M.E. 1981. Leptospirose: resultados das soroaçtinações realizadas no Instituto Biológico de São Paulo durante os anos de 1974/1980. Biológico, São Paulo, 47:299-309.
- Guerreiro H., Crodav J., Flannery B., Mazel M., Matsunaga J., Galvao Reis M., Levett P.N., Ko A.I. & Haake D.A. 2001. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. Infect. Immun. 69:4958-4968.
- Guida V.O., Santa Rosa C.A., D'Ápice M.O., Correa M.O. & Natale V. 1959. Pesquisa de aglutininas anti-leptospira no soro de bovinos do Estado de São Paulo. Arqs Inst. Biológico, São Paulo, 26:109-118.
- Haake D.A., Walker E.M., Blanco D.R., Bolin C.A., Miller M.N. & Lovett M.A. 1991. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar grippotyphosa during in vitro cultivation. Infect. Immun. 59(3):1131-1140.
- Haake D.A., Martinich C., Summers T.A., Shang E.S., Pruetz J.D., McCoy A.M., Mazel M.K. & Bolin C.A. 1998. Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: Downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection. Infect. Immun. 66(4):1579-1587.
- Haake D.A., Mazel M.K., McCoy A.M., Milward F., Chao G., Matsunaga J. & Wagar E.A. 1999. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. Infect. Immun. 67: 6572-6582.
- Haake D.A., Chao G., Zuerner R.L., Barnett J.K., Barnett D., Mazel M., Matsunaga J., Levett P.N. & Bolin C.A. 2000. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. Infect. Immun. 68:2276-2285.
- Haake D.A., Suchard M.A., Kelley M.M., Dundoo M., Alt D.P., Zuerner R.L. 2004. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. J. Bacteriol. 186:2818-2828.
- Herrmann G.P., Lage A.P., Moreira E.C., Haddad J.P.A., Resende J.R., Rodrigues R.O. & Leite R.C. 2004. Soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira* spp em ovinos nas mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. Ciência Rural 34:443-448.
- Koizumi N. & Watanabe H. 2004. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. Vaccine. 22(11/12):1545-1552.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-686.
- Lafetá B.N., Santos S., Silva V.L., Carvalho M.A.R., Diniz C.G. & Silva N. 2008. Determinação do perfil protéico da membrana externa de *Leptospira interrogans* sorovariedade Hardjoprajitino. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 60:1301-1306.
- Lage A.P., Leite R.M.H., Thompson J.A., Bandeira D.A., Herrmann G.P., Moreira E.C. & Gonçalves V.S.P. 2007. Serology for *Leptospira* sp in cattle of the State of Paraíba, Brazil. Arqs Inst. Biológico, São Paulo, 74:185-190.
- LeFebvre R.B., Thiermann A.B. & Foley J. 1987. Genetic and antigenic differences of serologically indistinguishable leptospirae of serovar hardjo. J. Clin. Microbiol. 25(11):2094-2097.
- Leite R.M.H., Leite R.C., Bandeira D.A. & Lage A.P. 2000. Surto de Leptospirose em rebanhos bovinos no Estado da Paraíba. Ciênc. Vet. Trop. 3:144-149.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:2665-275.
- Matsunaga J., Young T.A., Barnett J.K., Barnett D., Bolin C.A. & Haake D.A. 2002. Novel 45-kilodalton leptospiral protein that is processed to a 31-kilodalton growth-phase-regulated peripheral membrane protein. Infect. Immun. 70:323-334.
- Matsunaga J., Barocchi M.A., Croda J., Young T.A., Sanchez Y., Siqueira I., Bolin C.A., Reis M.G., Riley L.W., Haake D.A. & Ko A.I. 2003. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. Mol. Microbiol. 49:929-945.
- Moreira E.C. 1994. Avaliação de métodos para erradicação de leptospiroses em bovinos leiteiros. Tese de Doutorado, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 93p.
- Moreira E.C. 2010. Comunicação pessoal (Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG).
- Moreira E.C., Silva J.A., Viana F.C., Santos W.L.M., Anselmo F.P. & Leite R.C. 1979. Leptospirose bovina. I. Aglutininas anti-leptospiras em soros sanguíneos de bovinos em Minas Gerais. Arq. Esc. Vet. UFMG 31:375-388.
- Nally J.E., Artiushin S. & Timoney J.F. 2001. Molecular characterization of thermoinduced immunogenic proteins Q1p42 and Hsp15 of *Leptospira interrogans*. Infect. Immun. 69:7616-7624.
- Nicholson V.M. & Prescott J.F. 1993. Outer membrane proteins of three pathogenic *Leptospira* species. Vet. Microbiol. 36(1/2):123-138.
- Nunes-Edwards P.L., Thiermann A.B., Bassford Jr P.J. & Stamm L.V. 1985. Identification and characterization of the protein antigens of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. Infect. Immun. 48(2):492-497.
- Palaniappan R.U., Chang Y.F., Jusuf S.S., Artiushin S., Timoney J. F., McDonough S.P., Barr S.C., Divers T.J., Simpson K.W., McDonough P.L. & Mohammed H.O. 2002. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. Infect. Immun. 70:5924-5930.
- Pope V. & Johnson R.C. 1991. Effect of heat or formalin treatment of leptospirae on antibody response detected by immunoblotting. J. Clin. Microbiol. 29(7):1548-1550.
- Prescott J.F. & Zuerner R.L. 1993. *Leptospira*, p.287-296. In: Gyles C.L. & Thoen C.O. (Eds), Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 2<sup>nd</sup> ed. Iowa State University Press, Ames.
- Santa Rosa C.A., Castro A.F.P. & Troise C. 1961. Leptospirose bovina: inquérito sorológico na região de Campinas. Arqs Inst. Biológico, São Paulo, 28:169-173.
- Shang E.S., Summers T.A. & Haake D.A. 1996. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. Infect. Immun. 64:2322-2330.
- Sonrier C., Branger C., Michel V., Ruvoën-Clouet N., Ganière J.P. & André-Fontaine G. 2000. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. Vaccine 19(1):86-94.
- Terpstra W.J., Korver H., Van Leewen J., Klatser P.K. & Kolk A.H.J. 1985. The classification of Sejroe group serovars of *Leptospira interrogans* with monoclonal antibodies. Zentbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. (A), 259:498-506.
- Vasconcellos S.A., Barbarini Júnior O., Umehara O., Morais Z.M., Cortez A., Pinheiro S.R., Ferreira F., Fávero A.C.M. & Ferreira Neto J.S. 1997. Leptospirose bovina: níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. Período de janeiro a abril de 1996. Arqs Inst. Biológico, São Paulo, 64:7-15.
- Wolff J.W. 1969. History of *Leptospira hardjo*. Am. J. Vet. Res. 30:485.