

Obtención y purificación del antígeno O-específico de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae



PEDECIBA



T. Iglesias¹, M. I. Bessio², I. Telles³, F. Ferreira², G. Varela¹, C. Fontana³

1-Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UdelaR.; 2- Laboratorio de Carbohidratos y Glicoconjugados, DQO, Instituto de Higiene, Facultad de Química, UdelaR.; 3 - Laboratorio de Espectroscopia y Fisicoquímica Orgánica, DQL, CENUR Litoral Norte UdelaR.
tiglesias@higiene.edu.uy & mibessio@fq.edu.uy

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una zoonosis de amplia difusión mundial y en Uruguay afecta a aproximadamente 500-1000 personas por año. La enfermedad es producida por bacterias Gram-negativas del género *Leptospira*, espiroquetas que cubren la mayor parte de su superficie celular con lipopolisacáridos (LPS). Según se ha reportado previamente, algunas mutaciones que afectan la biosíntesis del LPS pueden producir cambios relevantes en la virulencia de estos microorganismos [1].

Los LPS están formados como se observa en la Fig 2, cuya cadena polisacarídica O-específica que se extiende hacia la parte exterior proporciona la mayor variabilidad estructural, sirviendo como base para la clasificación serológica en más de 250 serovares. Actualmente, las vacunas disponibles para ganado sólo incluyen unos pocos serovares, obviando hasta el momento algunos importantes en Uruguay [2].

OBJETIVOS

- Optimización de condiciones de cultivo de la cepa *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae
- Optimización de la extracción y purificación del LPS correspondiente
- Caracterización química del O-PS

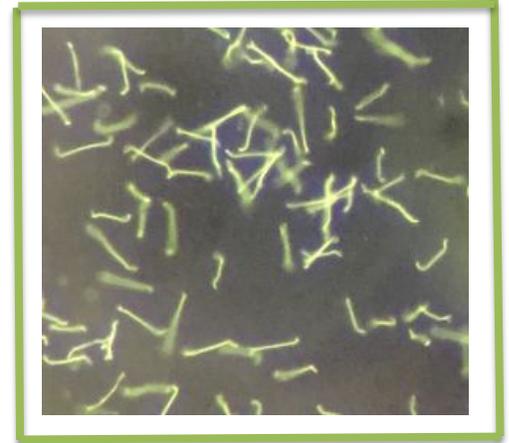


Figura 1: Observación de *Leptospiras* en campo oscuro 40x

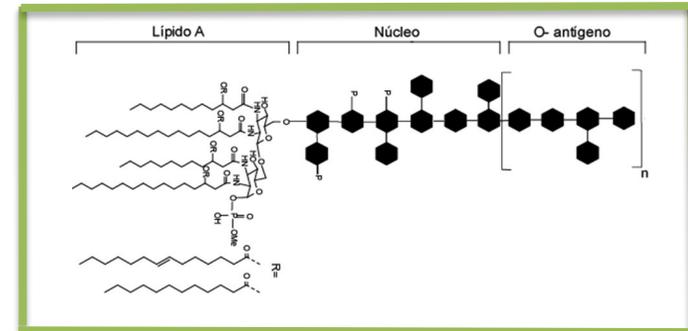


Figura 2: Esquema de LPS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo de cepas

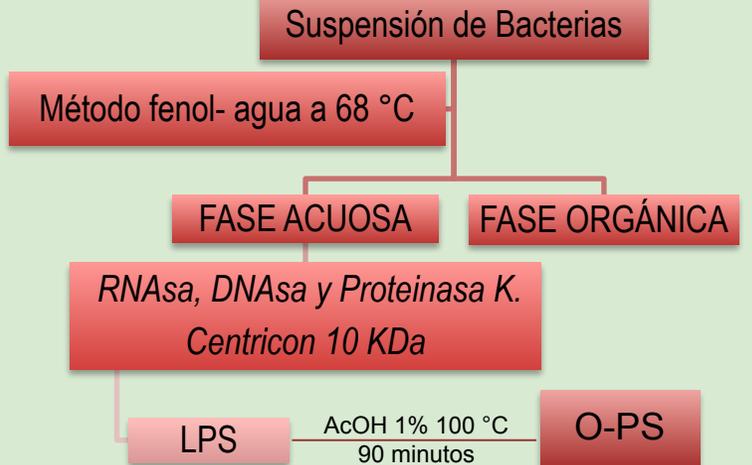
- Cepas de referencia del cepario, *Leptospira interrogans* (principalmente serovar Icterohaemorrhagiae)
- Medio de cultivo EMJH a 28 °C durante 1 semana aprox.
- Escalado para la obtención de 4L de cultivo

3. Purificación de O-PS

Purificación O-PS. Äkta Pure, columna Hiload 16/600 Superdex 30, FM: Butanol 1 %, flujo: 1 mL/min.

Espectroscopía de RMN: El espectro de ¹H RMN del O-PS fue obtenido en D₂O en un equipo Bruker Avance III 500 MHz equipado con una sonda TXI (1H/13C/15N). Se utilizaron 2k escanes y un tiempo de recuperación entre escanes de 7 s (el tiempo total del experimento fue de 4 hrs). Para su procesado se utilizó una función ventana exponencial (lb=1 Hz).

2. Extracción de LPS



RESULTADOS

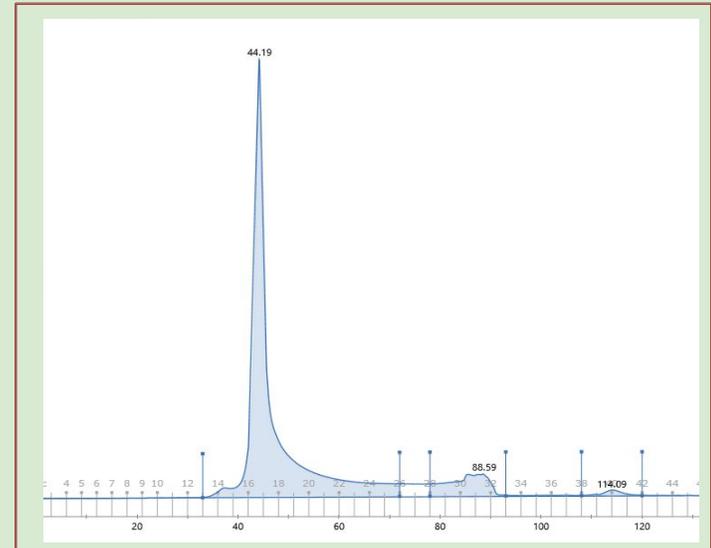
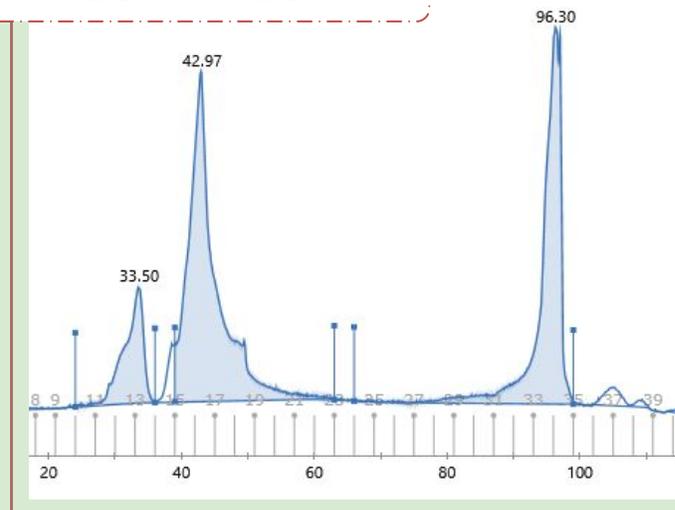


Figura 3: Se comparan los perfiles de dos extracciones diferentes. En la extracción de la izquierda hubo una etapa de lisis celular antes del tratamiento con fenol- agua caliente. O-PS fracciones 15 y 16.

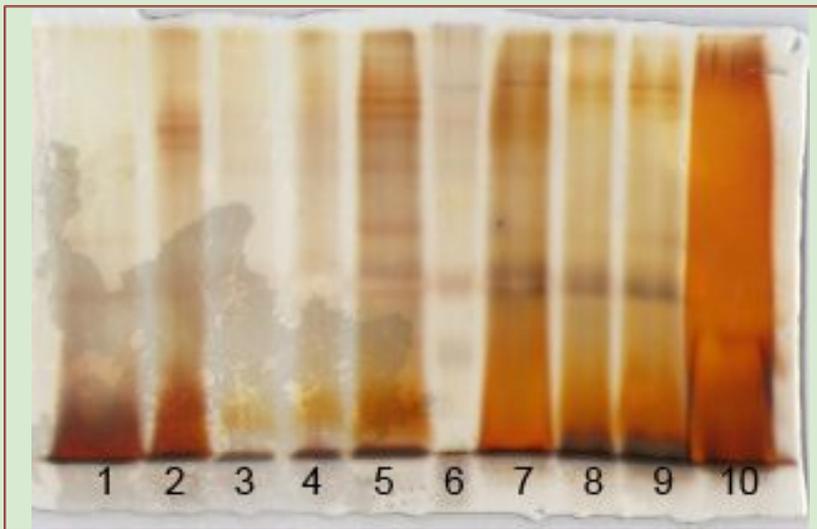


Figura 4: Electroforesis en gel de poliacrilamida 10%. 1: ICT; 2: AUT; 3: R435; 4: R464; 5: O201; 6: marcador Rainbow 7: CAN; 8: RTT17312; 9: H8783; 10: ICT (*Westphal y Jann*) Revelado AgNO_3 20%.

CONCLUSIONES

Si bien es preliminar, se está obteniendo por primera vez información sobre la estructura química de un O-PS de *Leptospira* muy complejo, siendo esto el punto de partida para un estudio estructural más exhaustivo que venimos llevando a cabo.

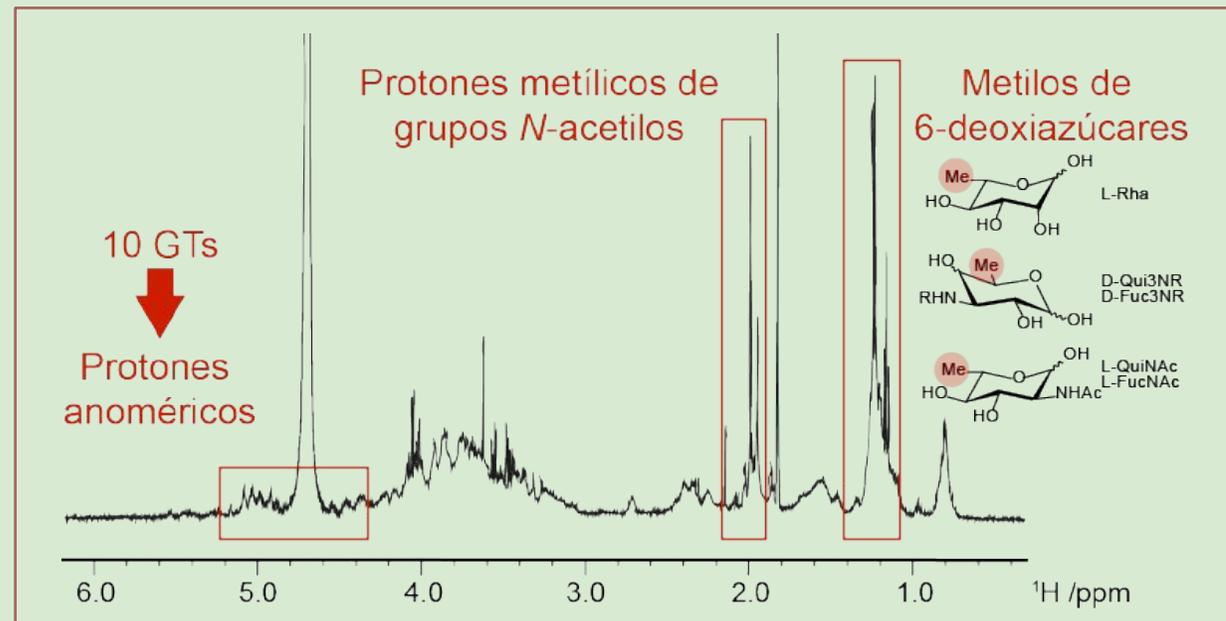


Figura 5: ^1H RMN del O-PS de *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae.

En el espectro de ^1H RMN del O-PS se observa un material complejo, con gran número de señales en la zona de los anoméricos, lo cual es consistente con las diez GTs presentes en el cluster de genes del O-Ag [4]. Entre otras cosas, se observan señales en ~ 1.2 ppm consistentes con la presencia de varios 6-deoxi-azúcares, que según la información genética podría tratarse de L-Rha, D-Hex3N y/o una L-HexNAc. También se observan señales alrededor de 2.0 ppm, indicando que algunos aminoazúcares podrían estar *N*-acetilados.

REFERENCIAS

- [1] Murray, G.; Srikrum, A.; Henry, R. et al. *Mol. Microbiol.* 2010, 78, 701-709. [2] Zarantonelli, L.; Suanes, A.; Meny, P. et al. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018, 12(9): e0006694. [4] Llona, J.D.; Cocco, S.; Bottini, G.; Fontana, C. Estudio bioinformático de clústeres de genes de antígenos O-específicos de *Leptospira*. Poster en ENAQUI6, Montevideo, 2019.