

» Editorial

Martínez-Martínez F, Faus MJ, Ruiz-López MD.

Originales

- » Educación sanitaria en la farmacia comunitaria: estudio controlado en la provincia de Castellón.

Castillo-García ML, Martínez-Raga J, López-Castellano AC, Castillo-García E.

- » Perfil antigénico celular de cepas aisladas de *Leptospira* en León y Chinandega, Nicaragua.

Batista N, Arencibia DF, Rosario LA, Jirón W, Duttman Ch.

- » Calidad del sueño y consumo de alcohol en una muestra de estudiantes de 18 a 30 años.

Bernabé Muñoz C, García-Corpas JP.

- » Impacto de los cambios realizados en la etapa de multiplicación celular durante la obtención de la Sustancia Sensibilizante de Eritrocitos utilizada en el diagnóstico serológico de la Leptospirosis.

Arencibia DF, Batista N, Fernández K, Rosario LA, Parra C, Blain K, García L.

Especial

- » Effect of pharmaceutical intervention on medication adherence and blood pressure control in treated hypertensive patients: Rationale, design and methods of the AFenPA pilot study.

Fikri-Benbrahim N, Sabater-Hernández D, Fikri-Benbrahim O, Faus MJ, Martínez-Martínez F, González-Segura Alsina D.

Perfil antigénico celular de cepas aisladas de *Leptospira* en León y Chinandega, Nicaragua.

Batista N¹, Arencibia DF¹, Rosario LA², Jirón W³, Duttman Ch³

1. Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, (Ciudad Habana, Cuba); 2. Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL, U.H), (Ciudad de la Habana, Cuba.); 3. Escuela de Veterinaria, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (León, Nicaragua.)

Original Paper Artículo Original

Correspondence: Ing. Niurka Batista Santiesteban.
Phone: 5372716911.
email: nbatista@finlay.edu.cu, darencibia@finlay.edu.cu

Received: 17.03.2011
Accepted: 21.09.2011

Competing interests:
Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

RESUMEN

Objetivo. El siguiente trabajo se desarrollo con el objetivo de determinar los perfiles antigénicos celulares que sean reconocidos por el suero de personas vacunados con vax-SPIRAL[®] de cepas obtenidas de los departamentos de León y Chinandega.

Métodos. Se analizaron cepas aisladas de hemocultivos tomadas de casos con sospecha clínica de leptospirosis, determinándose los perfiles antigénicos mediante electroforesis de células enteras y western blotting usando como anticuerpos, sueros provenientes de personas vacunadas con vax-SPIRAL[®].

Resultados y conclusiones. Se evidenció una gran homología antigénica entre todas las cepas estudiadas. Los resultados del presente estudio sugieren que en los departamentos de León y Chinandega circulan cepas de *L. interrogans* con un fuerte reconocimiento antigénico frente a sueros provenientes de personas vacunadas con vax-SPIRAL[®].

PALABRAS CLAVE: Leptospirosis, vax-SPIRAL[®], perfil antigénico celular, Nicaragua.

ABSTRACT

Objective. The following work was development with the objective of determining the profiles cellular antigenics that are recognized by the serum of people vaccinated with vax-SPIRAL[®] of obtained strains of the León and Chinandega departments.

Methods. Blood cultures samples were analyzed taken in sharp phase to cases with suspicion leptospirosis clinic, being determined the profiles antigenics by means of electrophoresis of whole cells and western blotting using as antibodies, serums coming from people vaccinated with vax-SPIRAL[®].

Results and conclusions. A great antigenic homology was evidenced among all the studied strains. The present study results suggest that in León and Chinandega departments circulate *L. interrogans* strains with a strong antigenic recognition front of serums of people vaccinated with vax-SPIRAL[®].

KEY WORDS: Leptospirosis, Vax-SPIRAL[®], antigenic cellular profile, Nicaragua.

INTRODUCCIÓN

Leptospira se ubica en el orden Spirochaetales, familia Leptospiraceae y género Leptospira. Este género comprende dos especies fenotípicas: *L. interrogans*, que agrupa a leptospirosas patógenas, agente causal de la leptospirosis en el hombre y los animales y *L. biflexa*, que incluye leptospirosas saprófitas de vida libre que se encuentran fundamentalmente en aguas superficiales y muy ocasionalmente en aguas marinas¹⁻⁴.

Durante los meses de octubre-noviembre del 2007, Nicaragua sufrió severas inundaciones provocadas por lluvias constantes, causadas por el huracán Félix, que condujeron al desarrollo de brotes de leptospirosis fundamentalmente en los Departamentos de León y Chinandega. De este brote se aislaron 16 cepas de Leptospira de pacientes con evidencia epidemiológica, serológica y sintomatología característica de Leptospirosis.

Las graves pérdidas económicas y humanas causadas por esta enfermedad justifican el uso de vacunas profilácticas en poblaciones humanas y animales bajo riesgo de infección⁵. Previo a la utilización de estas cepas con fines vacunales para su uso en humanos, resulta imprescindible una adecuada selección y caracterización microbiológica de las mismas.

Este trabajo se desarrolló con el objetivo de determinar los perfiles antigénicos celulares que sean reconocidos por el suero de personas vacunados con vax-SPIRAL® de estas cepas obtenidas y aisladas de los departamentos de León y Chinandega, Nicaragua.

MÉTODOS

Bacterias, aislamiento, crecimiento y conservación: Se utilizaron en el estudio 5 cepas procedentes de pacientes con evidencias clínicas, serológicas y epidemiológicas de la enfermedad leptospirósica del brote ocurrido en los departamentos de León y Chinandega, la parte más noroccidental de Nicaragua (Tabla 1). Se incluyeron además, como controles las cepas vacunales *L. interrogans* serovar Canicola, Copenhageni y Mozdok pertenecientes a la vacuna vax-Spiral®, las cuales fueron originalmente aisladas a partir de muestras de animales y luego remitidas al Centro Nacional de Epizootiología y Diagnóstico Veterinario de Ciudad de La Habana, Cuba.⁵ Todas las cepas fueron cultivadas en medio líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) a 28°C e inoculadas en hámster para determinar su grado de virulencia. Las cepas virulentas fueron almacenadas a -70°C, en nitrógeno líquido y en medio semisólido de Fletcher⁶, hasta su posterior utilización.

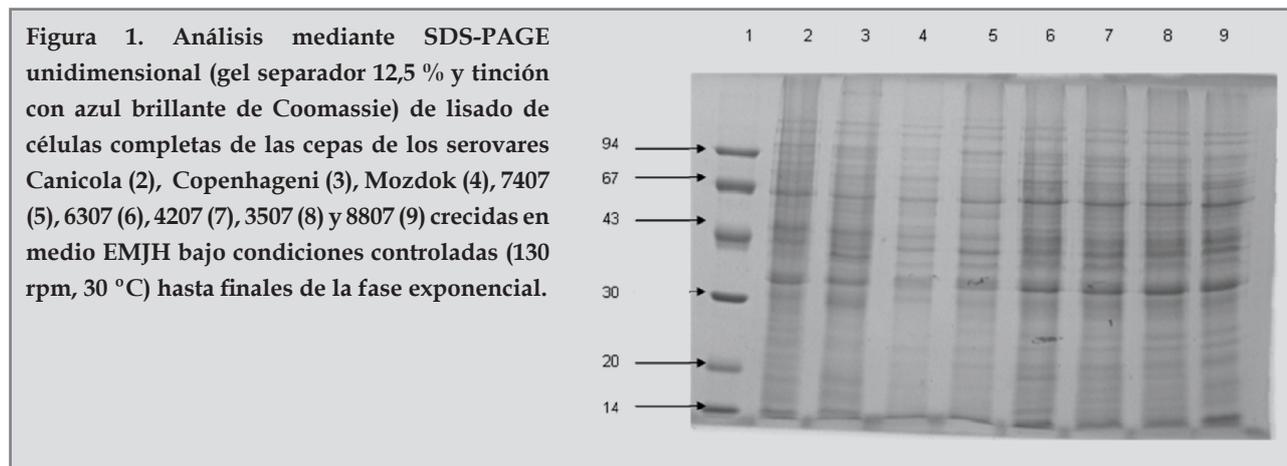
Tabla 1. Cepas empleadas en el estudio.

Serovar	Cepa	Procedencia
Serjoe	7407	León
Pomona	6307	Chinandega
Serjoe	4207	Chinandega
Ballum	8807	Chinandega
Icteroahemorrhagiae	3507	León

Perfiles antigénicos celulares: Muestras de 8x10⁹ células fueron tomadas de las cepas 3507, 4207, 6307, 7407, y 8807, pertenecientes a los casos clínicos, crecidas todas en medio EMJH bajo condiciones de agitación hasta finales de fase exponencial. Se colectaron por centrifugación a 10 000 rpm durante 20 min, se lavaron 3 veces con tampón fosfato salino pH 7,2 (TFS) y se solubilizaron con 100 µL de solución de lisis (62,5 mM Tris-HCl pH: 6,8, 10 % glicerol, 5 % 2-mercaptoetanol, 2 % SDS) calentando durante 10 min a 100 °C. Las muestras así tratadas fueron mantenidas durante toda la noche a 4 °C y luego separadas mediante SDS-PAGE unidimensional según el método de Laemmli,⁷ empleando un gel separador 12,5 %. Luego de la separación de las proteínas, los geles fueron teñidos convenientemente con azul brillante de Coomassie y analizados mediante analizador de imágenes (ImageMaster VDS, Pharmacia). Los resultados se mostraron como promedio del valor de cada banda analizada. Como patrón de peso molecular (PPM) se empleó una mezcla de proteínas de 94; 67; 43; 30; 20,1; 14,4 KDa (Pharmacia Biotech).

Inmunotransferencia: Los sueros utilizados fueron de personas previamente inmunizadas con vax-Spiral® en dos dosis de 0,5 mL por vía intramuscular separadas 6 semanas entre la primera y la segunda dosis. El suero utilizado en este ensayo fue procedente de 15 personas inmunizadas con el esquema de vacunación explicado con anterioridad. Posterior a la electroforesis, las muestras fueron transferidas a papel de nitrocelulosa, según Brúnete.⁸ La transferencia se realizó 2h utilizando como buffer 48 mM Tris pH 9,2, 39 mM glicina, 1,3 mM SDS y 20 % metanol. Para la detección antigénica, la nitrocelulosa fue bloqueada con leche descremada 3 % en Tris-salina y luego incubada a 37 °C durante toda la noche con suero de personas inmunizadas con vax-SPIRAL® diluida 1:50 en Tris-salina con 3 % de leche descremada y 0,05 % de Tween 20 (TSLT). Para la visualización de las bandas se incubó 1 h a 37 °C con conjugado IgG humana (SIGMA) diluido 1:1000 en TSLT y se reveló con diaminobencidina y peróxido de hidrógeno.

Procedimientos éticos: Los autores declaramos que este



trabajo fue aprobado por el comité de ética del Instituto Finlay, confeccionado sobre la base de buenas prácticas de laboratorio clínico presentes en el reglamento Nacional de aprobación de protocolos de investigación de la República de Cuba. Además se declara por parte de los autores del artículo que al comenzar esta investigación se obtuvo por escrito el consentimiento informado por parte de los individuos de los cuales se aislaron las 5 cepas en estudio.

RESULTADOS

Perfiles antigénicos celulares: El análisis de lisados de células completas permitió identificar la expresión de bandas antigénicas comunes para las cepas 3507, 4207, 6307, 7407, y 8807, con pesos moleculares entre 11 y 94,0 kDa (Figura 1). Estas bandas antigénicas fueron igualmente identificadas en las cepas autóctonas correspondientes a los serogrupos Ballum, Icterohaemorrhagiae y Pomona.

Para la cepa 3507 perteneciente al serogrupo Icterohaemorrhagiae fueron identificadas 16 bandas antigénicas con pesos moleculares similares con la cepa autóctona *L. interrogans* serogrupo Icterohaemorrhagiae. Las bandas de mayor intensidad fueron 25,30; 35,63; 40,43 y 58,13 kDa. Para la cepa 4207 perteneciente al serogrupo Serjoe, se identificaron 15 bandas antigénicas con pesos moleculares entre de 13,14 y 94,0 kDa. Las bandas de mayor intensidad fueron 22,23; 25,30; 31,85, 35,63; 39,41 y 58,90 kDa. Para la cepa 6307 perteneciente al serogrupo Pomona, se identificaron 19 bandas antigénicas con pesos moleculares que van desde de 10,90 hasta 93,7 kDa. Estas bandas igualmente fueron similares a las identificadas en la cepa autóctona *L. interrogans* serogrupo Pomona. Las bandas de mayor intensidad fueron 22,23; 25,00; 31,08; 35,19; 39,41 y 59,68 kDa.

Para la cepa 7407 perteneciente al serogrupo Serjoe, fueron identificadas 18 bandas antigénicas con pesos moleculares que van desde 13,27 hasta 93,88 kDa. Las bandas de mayor

intensidad fueron 25,60; 31,85; 36,08; 40,43; 60,48 y 71,88 kDa.

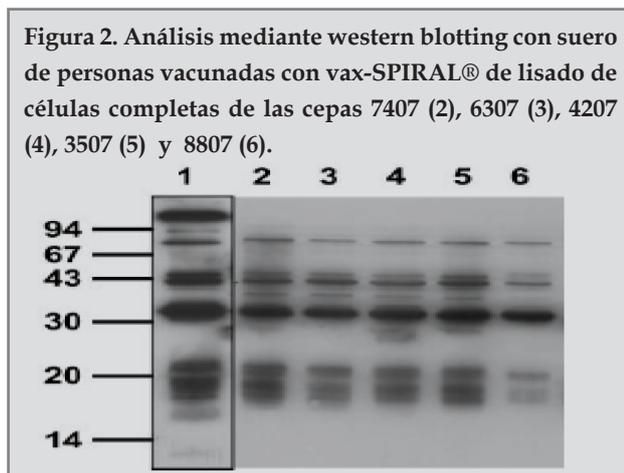
Para la cepa 8807 perteneciente al serogrupo Ballum, fueron identificadas 14 bandas antigénicas con pesos moleculares que van desde 13,22 hasta 93,90 kDa. Estas bandas igualmente fueron similares a las identificadas en la cepa autóctona *L. interrogans* serogrupo Ballum. Las bandas de mayor intensidad fueron 26,85; 34,75; 38,43; 42,01; 60,48 y 73,82 kDa.

Al aplicar la regresión lineal, 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. Por otra parte se pudo comprobar la comunidad antigénica de estas cepas con las cepas componentes de vax-SPIRAL®.

Inmunotransferencia: Algunos de estos antígenos celulares altamente conservados fueron reconocidos por el suero de personas vacunadas con vax-SPIRAL® (figura 2). Donde se evidenció reconocimiento a una amplia banda difusa por debajo de 20 kDa que pudiera corresponderse con proteínas ligadas al LPS de *Leptospira*, la banda de 21; 32; 36,7; 45,8, 49,4 y 70,9 kDa.

DISCUSIÓN

Numerosos estudios demuestran diferencias sustanciales en la expresión de antígenos importantes en la patogénesis de la enfermedad leptospirósica entre cepas isogénicas virulentas y avirulentas. Proteínas extracelulares, lipoproteínas de membrana externa y adhesinas, son expresadas mayormente por cepas virulentas que por sus variantes avirulentas. Esta desigual arquitectura antigénica al parecer se revierte en una desigual capacidad protectora de unas y otras cepas, al ser incluidas en preparados vacunales de células enteras, de ahí la vital importancia de que las cepas candidatas vacunales muestren una elevada



virulencia en los modelos animales^{9,10}. Mediante SDS-PAGE unidimensional utilizando un gel de poliacrilamida al 12,5% fue posible identificar la expresión de bandas antigénicas, localizadas aproximadamente desde los 14 kDa hasta más de 80 kDa, comunes para todas las cepas. Algunos de estos antígenos celulares altamente conservados fueron reconocidos por el suero de individuos vacunados con vax-SPIRAL®, lo cual corrobora no solo la expresión común en todas las cepas sino también su inmunorrelevancia. Al aplicar la regresión lineal, 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. Por otra parte se pudo comprobar la comunidad antigénica de estas cepas con las cepas componentes de vax-SPIRAL®.

Una gran diversidad de antígenos proteicos ha sido identificada mediante el estudio de los patrones electroforéticos de células completas de *Leptospira*. Estos antígenos en su mayoría se ubican entre los 10 y 143 kDa e incluyen proteínas citoplasmáticas, periplasmáticas y de membrana interna y externa.^{11,12}

La conservación antigénica de las proteínas ha sido demostrada mediante immunoblotting. El suero de humanos inmunizados con las tres cepas que componen a vax-SPIRAL® reconoce comúnmente numerosas proteínas de una gran variedad de serovares. Aunque comúnmente son identificados numerosos antígenos proteicos en perfiles electroforéticos de células completas o fracciones de estas, solo unos pocos han sido ampliamente reconocidos. Muchos de los antígenos proteicos celulares identificados en estas cepas pudieran corresponderse con algunas de las proteínas de *Leptospira* descritas y ampliamente caracterizadas en la literatura de la última década. Para tener la seguridad de ello sería necesario el reconocimiento de estas proteínas mediante immunoblotting empleando los antisueros

policlonales específicos a las mismas. No obstante, pudiéramos hacer estas inferencias dado que las proteínas descritas en la literatura son altamente conservadas entre serovares patógenos e incluso para algunas se ha comprobado la expresión en cepas pertenecientes a los serovares objeto de este estudio. 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 ADN¹³.

La banda antigénica de 34,32 kDa pudiera corresponderse con la principal lipoproteína de membrana externa de *Leptospira* LipL32¹⁴. LipL32 constituye el antígeno proteico más abundante en la membrana externa y el de mayor relevancia en la respuesta inmune frente a la infección natural, tanto en fase aguda como en convalecencia^{11,12} y ha sido vinculada directamente con la inducción de daño a nivel de los túbulos renales¹⁵. Estudios recientes utilizando espectrometría de masa han demostrado que LipL32 sufre modificaciones postraduccionales influenciadas por diversas condiciones ambientales, generando un gran número de proteínas de menor peso molecular con funciones aún desconocidas que son expresadas simultáneamente a la lipoproteína de membrana externa.¹¹ Algunos investigadores consideran a esta proteína como un marcador de infección altamente sensible y específico, sugiriendo su uso en técnicas serológicas para el diagnóstico temprano de la enfermedad leptospirósica¹². Otros sugieren que esta lipoproteína pudiera constituir un buen candidato para el desarrollo de una nueva generación de vacunas, capaces de conferir mediante métodos de inmunización una protección de amplio espectro¹⁶.

Otro antígeno identificado fue una proteína de 36 kDa, que pudiera corresponderse con la lipoproteína de membrana externa LipL36¹⁷. Al igual que LipL32, esta lipoproteína de 36 kDa es expresada por un gran número de serovares patógenos pero no por cepas saprófitas. Algunos investigadores consideran que esta proteína pudiera participar en la adaptación del microorganismo a las condiciones ambientales externas (al hospedero) una vez excretado a través de la orina, sugiriendo además que su aplicación como inmunógeno pudiera generar anticuerpos neutralizantes que ejerzan una acción rápida tras la entrada del patógeno al hospedero¹¹.

Otros antígenos proteicos de gran relevancia y altamente conservados en cepas patógenas como la proteína transmembrana OmpL1¹⁸ y la lipoproteína LipL41¹⁹ pudieran estar siendo expresados también por todas estas cepas. La proteína de membrana externa OmpL1 es una

proteína transmembrana que funciona como porina. Los niveles de expresión de esta porina son extremadamente bajos tanto *in vitro* como *in vivo*^{20,21} y algunos autores han correlacionado este hecho con el lento crecimiento de *Leptospira*. Esta proteína es muy sensible al calor y a las condiciones reductoras, mostrando un patrón de movilidad electroforética inusual. En su forma no desnaturalizada, la más abundante bajo las condiciones de separación empleadas en este trabajo, migra con una masa molecular aparente de 25 kDa; mientras que en su forma desnaturalizada migra mayoritariamente cercano a los 33 kDa¹⁸. Por su parte la lipoproteína LipL41 es expresada tanto en la membrana externa como en la membrana citoplasmática, pero a diferencia de LipL36 aparece expuesta en la superficie del microorganismo y no hacia el lado periplasmático de la membrana externa^{17,19}. Estudios recientes han demostrado un efecto sinérgico en la protección homóloga conferida por OmpL1 y LipL41 recombinantes al ser aplicadas juntas y asociadas a una membrana bacteriana.

Todas las cepas expresaron uniformemente una proteína de 45 kDa, la cual pudiera corresponderse con la lipoproteína de membrana interna LipL45, altamente conservada entre cepas patógenas de *Leptospira*²². Esta lipoproteína es expresada *in vivo*, pero en condiciones *in vitro* solo es expresada por cepas virulentas con un limitado número de subcultivos, por lo cual ha sido considerada como un marcador de virulencia²². LipL45 genera por clivaje postraducciona una proteína periférica de 31 kDa (P31) que se encuentra asociada tanto a la membrana externa como a la interna. P31 es expresada tanto *in vivo* como *in vitro*, pero su expresión no disminuye con la atenuación de la virulencia de la cepa tras numerosos subcultivos. Dada la ubicación no superficial de ambas proteínas en la célula no se produce un fuerte reconocimiento de las mismas por el suero de convalecientes, aunque sí por el suero de humanos inmunizados con células completas. Este resultado conllevó a los investigadores a concluir que la inmunización con suspensiones de células completas, a diferencia de la infección natural, permite la producción de anticuerpos contra antígenos inaccesibles al sistema inmune hospedero en una célula viva²². En este trabajo se apreció un fuerte reconocimiento por el suero de individuos vacunados con vax-SPIRAL® de antígenos proteicos altamente conservados ubicados en la zona de 35-36 kDa, los cuales pudieran corresponderse con proteínas no expuestas en la superficie del microorganismo como la lipoproteína LipL36 y las proteínas flagelares de 35 y 36 kDa²³. Otras proteínas celulares de *Leptospira* como LipL48, OmpL39 o las adhesinas de 36 kDa también pudieran estar siendo expresadas por todas estas cepas. Análisis

mediante SDS-PAGE bidimensional y espectrometría de masa han identificado un mínimo de 67 especies proteicas individuales solo en la membrana externa de *Leptospira*, incluyendo al menos 12 como productos de genes diferentes¹³.

CONCLUSIÓN

Se evidenció una gran homología antigénica entre todas las cepas estudiadas. Los resultados del presente estudio sugieren que en los departamentos de León y Chinandega circulan cepas de *L. interrogans* con un fuerte reconocimiento antigénico frente a sueros provenientes de personas vacunadas con vax-SPIRAL®.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cachay ER, Vinetz JM. A global research agenda for leptospirosis. *Journ Postgrad Med.* 2005; 51(3):174-178.
2. Boursaux C, Saint Girons I, Zuerner RL. *Leptospira* genomics. *Electrophoresis.* 1998; 19:589-592.
3. Silva EF, Medeiros MA, McBride AJ, Matsunaga J, Esteves GS, Ramos JG. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. *Vaccine.* 2007; 25: 6277-6286.
4. Sandow K, Ramírez W. Leptospirosis. *REDVET.* 2005; 6(6):13-15.
5. González A, Rodríguez Y, Batista N, Valdés Y, Núñez JF, Mirabal M. Inmunogenicidad y capacidad protectora en hámsters de vacunas antileptosirósicas monovalentes de células enteras del serogrupo Ballum. *Rev Argent Microbiol.* 2005; 37:169-175.
6. Flecher W. Recent work on leptospirosis, tsutsugamushi disease and tropical typhus in the Federated Malay States. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1928; 21:265-282.
7. Laemmli NK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.
8. Burnnente WN. Western Blotting electrophoretic transfer of protein from sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibodies and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1980; 112:192-200.
9. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14(2): 296-326.
10. 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.
11. Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun.* 2001; 69(8):4958-4968.
12. 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): 144-152.
13. Hsieh 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):339-345.
14. Yang CW, Wu MS, Pan MJ, Hsieh WJ, Vandewalle A, Huang CC. The *Leptospira* outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2002; 13(8):2037-2045.
15. Branger C, Sonrier C, Chatrenet B, Klonjowski B, Ruvoen-Clouet N. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. *Infect Immun*. 2001; 69(11):6831-6838.
16. Haake DA, Martinich C, Summers TA, et al. Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: Downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection. *Infect Immun*. 1998; 66(4):1579-1587.
17. Shang ES, Exner MM, Summers TA, et al. The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. *Infect Immun*. 1995; 63(8):3174-3181.
18. Shang ES, Summers TA, Haake DA. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira*. *Infect Immun*. 1996; 64(6): 2322-2330.
19. Barnett J, Barnett D, Bolin C, Summers T, Wagar E. Expression and distribution of *Leptospira* outer membrane components during renal infection of hamsters. *Infect Immun*. 1999; 67(2):853-861.
20. Haake DA, Walker EM, Blanco DR, Bolin CA, Miller JN. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar grippityphosa during in vitro cultivation. *Infect Immun*. 1991; 59(3):1131-1140.
21. Haake DA, Mazel MK, McCoy AM, et al. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun*. 1999; 67:6572-6582.
22. Kelson JS, Adler B, Chapman AJ, Faine S. Identification of leptospiral flagellar antigens by gel electrophoresis and immunoblotting. *J Med Microbiol*. 1988; 26:47-53.
23. Haake DA, Matsunaga J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. *Infect Immun*. 2002; 70(9):4936-4945.