

## UTILIZAÇÃO DA IMUNOSSEPARAÇÃO MAGNÉTICA PARA O ISOLAMENTO E CULTIVO DE *Leptospira sp.*

**LUIZ, João Paulo Mesquita<sup>1</sup>; LEAL, Fernanda dos Anjos<sup>1</sup>; MONTE, Leonardo Garcia<sup>1,2</sup>; DELLAGOSTIN, Odir<sup>3</sup>; HARTLEBEN, Cláudia Pinho<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Imunodiagnóstico, <sup>2</sup>Laboratório de Imunologia Aplicada, <sup>3</sup>Laboratório de Vacinologia. Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).  
[joapaulomesquita@hotmail.com](mailto:joapaulomesquita@hotmail.com)

### 1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é reconhecida como uma importante doença zoonótica amplamente distribuída no mundo inteiro, causada pela infecção de espécies patogênicas de *Leptospira* (FAINE et al., 1999).

A separação imunomagnética (IMS) é caracterizada por pequenas partículas magnéticas cobertas com anticorpos específicos contra antígenos de superfície de células e tem se mostrado eficiente para o isolamento de células eucarióticas e procarióticas, como bactérias e vírus (OLSVIK et al., 1994). O isolamento de bactérias através da IMS tem sido geralmente realizada pela inoculação em meios de cultivo, seletivos ou não, das células alvo ligadas as esferas (OLSVIK et al., 1994). Ainda, a IMS tem sido usada visando aumentar a sensibilidade da PCR e melhorar o isolamento bacteriano de amostras clínicas, as quais contêm substâncias inibitórias ou organismos contaminantes. No primeiro ensaio de IMS associado a PCR para diagnóstico de leptospirose em urina bovina foram utilizados anticorpos monoclonais (mAbs) específicos contra *L. borgpetersenii* (TAYLOR et al., 1997). YAN e TAYLOR et al., (1998) descreveu uma IMS associada a um imunoenensaio fluorimétrico, para detecção de *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo em urina bovina.

A principal proteína de membrana de leptospiros, LipL32, é exclusiva e altamente conservada entre espécies patogênicas. MAbs anti rLipL32 foram capazes de detectar somente leptospiros patogênicas (FERNANDES et al., 2007). A IMS associada à PCR foi altamente sensível, específica e rápida para a detecção de leptospiros patogênicas em soro e urina de humanos (FERNANDES et al., 2008). Recentemente SCHREIER et al., (2012) desenvolveram dois tipos de ensaio para detectar contaminação por leptospiros em amostras de água combinando IMS com microscopia de fluorescência.

O isolamento de leptospiros a partir de tecidos animais e humanos, urina e sêmen tem sido muitas vezes difícil, devido à presença de contaminação, uma vez que métodos estritamente assépticos de coleta não são sempre possíveis sob condições de campo (HUSSAINI e RUBY et al., 1976). SCHÖNBERG et al., (1981) observaram que o isolamento de leptospiros a partir de material com grande quantidade bacteriana é difícil, pois o rápido crescimento de bactérias oportunistas leva à morte de leptospiros.

Por este motivo, o objetivo deste trabalho foi utilizar a IMS e anticorpos policlonais anti-rLipL32 (pAb/rLipL32) para adsorção de partículas magnéticas e avaliar sua utilização na separação de leptospiros a partir de cultivos puros da bactéria, visando a futura utilização deste insumo na detecção de leptospiros de

fluídos biológicos para isolamento, cultivo e obtenção de novos isolados de *Leptospira sp.*

## 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

A bactéria utilizada pertence à espécie *Leptospira interrogans* sorovar Canicola cepa Hond Utrecht IV. Os cultivos de leptospira foram mantidos durante 7 dias a 30°C em meio líquido Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris (EMJH, Difco-USA) com adição de 8% de suplemento Difco-USA, sem antibiótico. A concentração de leptospiras foi ajustada utilizando câmara de Petroff-Hausser.

O anticorpo policlonal contra rLipL32 foi produzido em um coelho macho (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia albino de acordo com os protocolos estabelecidos por HARLOW & LANE (1988). O pAb/rLipL32 foi purificado por cromatografia de afinidade em coluna de proteína A-Sepharose CL-4B (GE Healthcare Company, USA) de acordo com as recomendações do fabricante e de HARLOW & LANE (1988). O pAb/rLipL32 foi adsorvido em partículas magnéticas de poliestireno cobertas por proteína A (Bangs Laboratories Inc, Fishers, IN, USA) segundo os procedimentos estabelecidos por FERNANDES et.al, 2007. Resumidamente, 100 µL de esferas com 1% de sólidos foram ressuspendidas e lavadas duas vezes com tampão borato 50 mM, pH 8,2 (TB). Em seguida, 1,2 mg de pAb/rLipL32 foi incubado com as partículas por 16 h a 4 °C. Após, as partículas foram lavadas duas vezes com TB utilizando separador magnético (Invitrogen Corporation, CA, USA) e ressuspendidas no mesmo tampão até o uso.

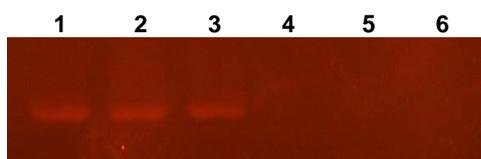
A IMS para o isolamento e cultivo de *Leptospira sp.* foi realizada em cultivos contendo diferentes concentrações de *L. interrogans* sorovar Canicola. Para tal, 10 µL de partículas adsorvidas com pAb/rLipL32 foram adicionadas a 1 mL de meio EMJH contendo  $10^5$  a  $10^0$  leptospiras/mL, levemente agitados durante 15 minutos a temperatura ambiente e então lavados 2x com TB utilizando separador magnético. O produto da IMS foi inoculado em 1 mL de meio EMJH, incubados a 30°C durante dez dias. Para verificar o crescimento bacteriano as alíquotas do cultivo pós IMS correspondentes às concentrações iniciais imunoseparadas foram visualizadas em microscopia de campo escuro (MCE) [Olympus BX51].

A técnica de PCR foi utilizada para confirmar o crescimento bacteriano de leptospiras e para verificar a eficiência do isolamento pela técnica de IMS. Para a técnica de PCR, os recultivos foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 min, ressuspendidos em 50 µL de tampão para extração de DNA (1:1 de SDS 0,125% e NaOH 0,05 M) e aquecidos a 100°C durante 10 minutos. A reação de PCR foi conduzida utilizando um par de primers que amplificam a região de 264 pb do gene codificador da proteína LipL32 em condições já estabelecidas (NASSI et al., 2003). A amplificação foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% com corante *Blue Green* (LGC).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As partículas magnéticas cobertas com o pAb/rLipL32 foram testadas em um ensaio piloto de IMS com cultivos puros de *L. interrogans* em diferentes concentrações que variaram de  $10^5$  a  $10^0$ . O ensaio de IMS foi capaz de capturar as bactérias, sendo possível o recultivo em meio EMJH. A partir do décimo dia foi possível visualizar leptospiras nos recultivos dos produtos imunoseparados

oriundos dos meios EMJH contendo  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  leptospiras por mL. O limite de captura do ensaio para o recultivo foi de  $10^3$  bactérias por mL. Este resultado é promissor, uma vez que a visualização de 1 bactéria por campo na pesquisa direta em MCE corresponde a  $10^4$  leptospiras/mL. Também foi possível verificar a contaminação em alguns recultivos por outros microrganismos os quais podem ser removidos por filtração em filtros de celulose de 0,2  $\mu\text{m}$ , pelo uso de meio seletivo contendo sódio de sulfathiazole, sulfato de neomicina e cicloheximida e também pela inoculação em tubo-U contendo meio de cultivo semi-sólido para leptospiras (FAINE et al., 1999).



**Figura 1:** Avaliação da eficiência da IMS para isolamento e cultivo de *Leptospira sp* por PCR. Eletroforese em gel de agarose para análise de PCR dos recultivos do produto imunoseparado de cultivos contendo diferentes concentrações de leptospiras. 1 –  $10^5$ , 2 –  $10^4$ , 3 –  $10^3$ , 4 –  $10^2$ , 5 –  $10^1$ , 6 –  $10^0$  leptospiras por mL.

A técnica de PCR foi utilizada como teste qualitativo para verificar a presença de leptospiras no recultivo. A técnica confirmou os resultados da visualização em microscopia de campo escuro, havendo a amplificação da região de 264 pb do gene LipL32 nos recultivos do produto imunoseparado oriundos dos meios EMJH contendo  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  leptospiras por mL.

A metodologia IMS tem sido utilizada para a detecção de leptospiras associada à técnica de PCR (FERNANDES et al., 2008), mas seu potencial para o cultivo e isolamento de cepas de *Leptospira sp.* não havia ainda sido investigado. Neste estudo foi demonstrada a utilização da metodologia de IMS, associada a um pAb específico, para isolamento e cultivo em um ensaio piloto como uma ferramenta promissora para o isolamento de espécies de *Leptospira sp* patogênicas.

#### 4 CONCLUSÃO

A separação magnética utilizando pAb/rLipL32 foi eficiente para o isolamento de leptospiras a partir de cultivos puros. Os próximos experimentos serão realizados para avaliar a metodologia em amostras de sangue e urina de animais experimentalmente infectados e em amostras clínicas de animais suspeitos de leptospirose.

#### 5 REFERÊNCIAS

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C. A.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis.** Melbourne, Australia: MediSci, 1999.

FERNANDES, C.P.; SEIXAS, F.K.; COUTINHO, M.L.; VASCONCELLOS, F.A.; MOREIRA, A.N.; CONCEIÇÃO, F.R.; DELLAGOSTIN, O.A.; ALEIXO, J.A.. An immunomagnetic separation-PCR method for detection of pathogenic *Leptospira* in biological fluids. **Hybridoma**, v. 27, p.381-6, 2008.

FERNANDES, C.P.; SEIXAS, F.K.; COUTINHO, M.L.; VASCONCELLOS, F.A.; SEYFFERT, N.; CRODA, J.; MCBRIDE, A.J.; KO, A.I.; DELLAGOSTIN, O.A.; ALEIXO, J.A. Monoclonal antibodies against LipL32, the major outer membrane protein of pathogenic *Leptospira*: production, characterization, and testing in diagnostic applications. **Hybridoma**, v. 26, p. 35-41, 2007.

HARLOW, E.; LANE, P. Monoclonal Antibodies. **Antibodies: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p. 139, 1988.

HUSSAINI, S.N.; RUBY, K.R. Comparative studies on the use of 5-fluorouracil in two different media as a selective agent for isolation of leptospira. **Research in Veterinary Science**, v. 20, p. 148-50, 1976.

NASSI, F.; SEIXAS, F.K.; JOUGLARD, S.D.D.; SIMIONATTO, S.; SILVA, E.F.; SEYFFERT, N.; BROD, C.S; DELLAGOSTIN, O.A. Leptospirosis diagnosis using Nested-PCR. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, suppl.1, 2003.

OLSVIK, O.; POPOVIC, T.; SKJERVE, E.; CUDJOE, K.S.; HORNES, E.; UGELSTAD, J.; UHLÉN, M. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, p. 43–54, 1994.

TAYLOR, M.J.; ELLIS, W.A.; MONTGOMERY, J.M.; YAN, K.T.; MCDOWELL, S.W.J; MACKIE, D.P. Magnetic immuno capture PCR assay (MIPA): detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. **Veterinary Microbiology**, v. 56, p. 135–145, 1997.

SCHÖNBERG, A. Studies on the effect of antibiotic substances on leptospire and their cultivation from material with a high bacterial count. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene**, v. 249: p. 400-406, 1981.

SCHREIER, S.; DOUNGCHAWEE, G.; TRIAMPO, D.; WANGROONGSARB, P.; HARTSKEERL, R.A.; TRIAMPO, W. Development of a magnetic bead fluorescence microscopy immunoassay to detect and quantify *Leptospira* in environmental water samples. **Acta Tropica**, v. 122, p. 119–125, 2012.

YAN, K.T.; ELLIS, W.A.; MONTGOMERY, J.M; TAYLOR, M.J.; MACKIE, D.P.; MCDOWELL, S.W.J. Development of an immunomagnetic antigen capture system for detecting leptospire in bovine urine. **Research in Veterinary Science**; v. 64, p. 119–124, 1998.