

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE SEPARAÇÃO MAGNÉTICA (IMS) PARA O ISOLAMENTO E CULTIVO DE *Leptospira* sp.

MONTE, Leonardo Garcia¹; REMIÃO, Mariana Härter¹, HARTLEBEN, Cláudia Pinho^{1,3}; SEIXAS, Fabiana Kömmling²; DELLAGOSTIN, Odir Antonio²; ALEIXO, José Antonio Guimarães¹, CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo¹.

¹ Laboratório de Imunologia Aplicada – Centro de Biotecnologia, Cenbiot/UFPeL.

² Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Biotecnologia, Cenbiot/UFPeL.

³ Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária/UFPeL.

Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900.

marri.hr@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose causada por mais de 260 sorovares patogênicos pertencentes ao gênero *Leptospira* (Adler & Moctezuma, 2009). O número de sorovares e sorogrupos descritos aumentam com os esforços despendidos no isolamento e caracterização da bactéria. Antes de 1989 o gênero *Leptospira* era dividido, usando-se critérios antigênicos, em duas espécies: *L. interrogans*, da qual faziam parte todas as cepas patogênicas, e *L. biflexa*, contendo cepas saprófitas (Levett, 2001). Porém, a análise molecular tem sido aplicada na classificação de *L. interrogans lato sensu* (Faine, 1999) e conduzido a várias espécies dentro deste gênero: *L. interrogans stricto sensu*, *L. santarosai*, *L. weilii*, *L. inadai*, *L. wolbachii*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschnerii*, *L. meyeri* e *L. noguchii* (Yasuda, 1987; Ramadass et al., 1992). A essa classificação foram adicionadas 5 genomoespécies (Brenner et al., 1999) e recentemente, uma nova espécie denominada *L. broomii* foi relatada (Levett et al., 2006).

O isolamento e cultivo de sorovares de *Leptospira* infectantes por área geográfica estão entre as metas da vigilância epidemiológica para esta doença no Brasil (Ko et al., 1999), visando o entendimento dos reservatórios epidemiológicos e ecológicos envolvidos na cadeia epidemiológica da enfermidade. Contudo, a obtenção de isolados desta bactéria tem sido reportada como demorada e, em muitos casos, sem sucesso (Levett, 2001; Faine, 1999) devido à presença de microrganismos contaminantes, presentes em fluídos biológicos do hospedeiro, os quais possuem crescimento rápido em meios de cultivo, esgotando os nutrientes necessários ao crescimento de bactérias fastidiosas como a *Leptospira* (Faine, 1999). Ainda, a presença de anticorpos e complemento em amostras de soro sanguíneo ou soro de leite são limitantes para o crescimento da bactéria *in vitro* (Faine, 1999).

Diversas proteínas de membrana externa (OMP) em leptospiros patogênicas já foram estudadas e caracterizadas até o momento, tal como LipL32, LipL21 e LipL41 (Cullen et al., 2005). A LipL32 é considerada a principal OMP de leptospiros

patogênicas e o antígeno imunodominante reconhecido durante a resposta imune humoral em indivíduos com leptospirose (Hauk et al., 2008) e anticorpos monoclonais anti LipL32 foram caracterizados quanto ao seu potencial de uso para detecção de leptospirosas patogênicas (Fernandes et al., 2007).

A separação imunomagnética (IMS) é uma técnica imunológica que tem sido aplicada na detecção de diversos organismos patogênicos e pode ser associada a técnicas laboratoriais de rotina, como o PCR e o isolamento celular (Olsvik, 1994).

Por este motivo, o objetivo deste trabalho é padronizar a aplicação da técnica de separação magnética (IMS), utilizando anticorpos monoclonais e policlonais anti LipL32 para capturar, isolar e cultivar leptospirosas patogênicas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Hibridomas secretores de anticorpos anti LipL32 foram recuperados do estoque em nitrogênio líquido, cultivados e inoculados em camundongos da linhagem BalbC conforme protocolos estabelecidos (Harlow & Lane, 1988). Soros hiperimunes anti LipL32 foram produzidos conforme Cevenini et al., 1991. Os anticorpos, obtidos por fluido ascítico, foram purificados por cromatografia de afinidade em coluna de proteína G-Sepharose (GE Healthcare Company, USA) seguindo as instruções do fabricante e a concentração final mensurada em espectrofotômetro a 280 nm.

Os anticorpos anti LipL32 foram adsorvidos em micropartículas magnéticas de poliestireno (Bangs Laboratories Inc., Fishers, IN) conforme protocolo estabelecido por Conceição (2004). Brevemente, as micropartículas foram lavadas e ressuspendidas em 1 mL de tampão borato pH 8.2 50 mM contendo 1.2 mg de anticorpo e incubadas overnight a 4°C. Após, novamente lavadas e suspendidas em tampão de estoque (100 mM borato pH 8.5, 0.1% bovine serum albumin [BSA], 0.05 Tween 20, 10 mM EDTA, 0.1% NaN₃).

Para a separação magnética (IMS) foram utilizados os volumes de 10 µL e 20 µL das micropartículas cobertas com os anticorpos em um cultivo de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 contendo 10⁴ bactérias por mL. As amostras foram levemente agitadas por 15 min a temperatura ambiente e lavadas por três vezes. Durante todas as etapas foi usado um separador magnético (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Para o controle da captura das bactérias pelas micropartículas foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR), conforme Fernandes (2008). Os produtos obtidos na IMS tiveram destinos distintos: foram ressuspendidos em tampão de extração (50 mM de NaOH e 12,5% de SDS), fervidos e estocados a -20°C até o uso na PCR e adicionados em meio líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH, Difco-USA) com adição de 10% de suplemento Difco-USA, sem antibióticos. A verificação do crescimento bacteriano foi monitorada semanalmente, através de microscopia ótica em campo escuro (Olympus BX 51).

Na PCR foram utilizados os primers *lipL32* F: 5' CGC TTG TGG TGC TTT CGG TGG T 3' e *lipL32* R: 5' CTC ACC GAT TTC GCC TGT TGG G 3', os quais amplificam uma região de 264pb do gene LipL32. Resumidamente, 4µL de DNA-IMS *template* foi adicionado aos tubos com 1U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) 150 ng de primers, 2.5 µL tampão de reação 10Xs e MgCl₂ e 0.2 mM dNTP. A amplificação foi realizada em um Perkin Elmer 2400 thermocycler (PE Biosystems, Foster City, CA). O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel agarose e visualizado sobre UV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adsorção dos anticorpos as micropartículas foi eficiente, uma vez que foi possível capturar bactérias e amplificar o alvo por PCR utilizando 10^4 células por mL (Figura 1), concentração bacteriana na qual é possível a visualização de 1 bactéria por campo microscópico (Faine, 1999). No cultivo bacteriano a partir da IMS foi possível a visualização de leptospiros a partir do inoculo contendo 20 μ L de micropartículas, adsorvidas com anticorpo policlonal e monoclonal. Contudo, até o momento, não foi possível obter crescimento bacteriano com concentração igual à utilizada para realização da IMS, provavelmente devido à baixa concentração bacteriana utilizada para inoculo e geração bacteriana maior de 10 h. O alvo dos anticorpos está presente em todas as leptospiros patogênicas (Haake et al., 2000) o que possibilita a captura e o cultivo de diferentes espécies patogênicas desta bactéria. Até o momento, os resultados aqui obtidos sugerem que a metodologia de IMS utilizando anticorpos anti LipL32 é uma ferramenta possível de ser aplicada no isolamento e cultivo de leptospiros.

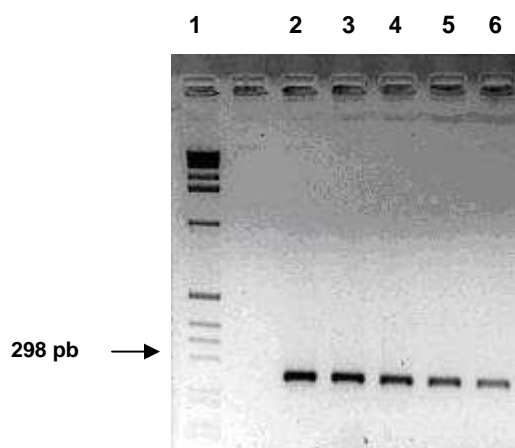


Figura 1. PCR realizada com o produto da IMS, a partir do cultivo de *L. interrogans* contendo 10^4 células por mL. 1- Marcador 1Kb DNA ladder plus (Invitrogen); 2- DNA genômico de *L. interrogans*; 3 e 4 - IMS/PCR utilizando 20 μ L de micropartículas com o anticorpo monoclonal e policlonal anti LipL32, respectivamente; Linhas 5 e 6 - IMS/PCR utilizando 10 μ L de micropartículas com o anticorpo monoclonal e anticorpo policlonal anti LipL32, respectivamente.

4. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo nos levam a concluir que a metodologia de IMS, utilizando anticorpos anti LipL32, é capaz de capturar leptospiros e possui potencial para uso em ensaios que utilizem a IMS para a captura e o isolamento de leptospiros.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B.; MOCTEZUMA A. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary and Microbiology**. In press. 2009.
- BRENNER, D. J.; KAUFMANN, A. F.; SULZER, K. R.; STEIGERWALT, A. G.; ROGERS, F. C.; WEYANT, R. S. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira*

alexanderi sp nov and four new *Leptospira* genomospecies. **International Journal of Systematics Bacteriology**, v. 49, p. 839-58, 1999.

CEVENINI, R.; SAMBRI, V.; PILERI, S.; RATTI, G.; LA PLACA, M.;. Development of transplantable ascites tumours which continuously produce polyclonal antibodies in pristane primed BALB/c mice immunized with bacterial antigens and complete Freund's adjuvant. **Journal Immunological Methods**, 140, p. 111-118, 1991.

CONCEIÇÃO , R. C. S.; MOREIRA, Â. N.; RAMOS R. J.; G.OULARTE F. L.; CARVALHAL J. B.; J A. G. ALEIXO. Detection of *Salmonella* sp in chicken cuts using immunomagnetic separation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 173-177, 2008.

CULLEN, P. A.; XU, X.; MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; KO, A. I.; HAAKE, D.; ADLER, B. Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 4853-4863, 2005.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira* and Leptospirosis. **MedSci, Melbourne**, 2nd.ed., 272p, 1999.

FERNANDES, C. H.; 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.381-386, 2008.

HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N.; BOLIN, C. A. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 2276-2285, 2000.

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

HAUK, P.; MACEDO, F.; ROMERO, C. E; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; BARBOSA, A. S. AND HO, P. L. In LipL32, the Major Leptospiral Lipoprotein, the C Terminus Is the Primary Immunogenic Domain and Mediates Interaction with Collagen IV and Plasma Fibronectin. **Infection and Immunity**, v.76, p. 2642-2650, 2008.

KO, A. I.; REIS, M. G.; DOURADO, C. M. R.; JONHSON, W. D.; RILEY, L. W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **Salvador Leptospirosis Study Group Lancet**, v. 354, p. 820-825, 1999.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p. 296-326, 2001.

LEVETT, P. N.; MOREY, R. E.; GALLOWAY, R. L.; STEIGERWALT, A. G. *Leptospira broomii* sp nov., isolated from humans with leptospirosis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 671-673, 2006.

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

RAMADASS, P.; JARVIS, B. D.; CORNER, R. J.; PENNY, D.; MARSHALL, R. B. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, p. 215-19, 1992.

YASUDA, P. H.; STEIGERWALT, A. G.; SULZER, K. R.; KAUFMANN, A. F.; ROGERS, F.; BRENNER, D. J. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. **International Journal of Systematics Bacteriology**, v. 37, p. 407-15, 1987.