

## AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA DA LEPTOSPIROSE

**LUZ, João Paulo Mesquita; MONTE, Lázaro de; DELLAGOSTIN, Odir;  
CONCEIÇÃO, Fabrício; HARTLEBEN, Cláudia Piñeira**

1- Laboratório de Imunologia Aplicada; 2- Laboratório de Biologia Molecular. Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CETEC), Núcleo de Biotecnologia e Universidade Federal de Pelotas

[joaopaulomesquita@hotmail.com](mailto:joaopaulomesquita@hotmail.com)/[claudia.hartleben@pq.cnpq.br](mailto:claudia.hartleben@pq.cnpq.br)

### 1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, causada por bactérias do gênero *Leptospira* (FAINE et al, 1999). As leptospirosas são capazes de colonizar os hospedeiros cronicamente infectados, de onde são eliminadas na urina, sobrevivendo por longos períodos em ambientes aquáticos. A transmissão da leptospirose a novos hospedeiros pode ocorrer através do contato com a urina ou tecidos de animais infectados ou pelo contato indireto com a água contaminada (MONAHAN et al, 2009).

A separação imunomagnética (IMS) é uma técnica de separação e concentração de organismos que tem sido aplicada para a detecção de bactérias patogênicas em amostras de água, com o intuito de reduzir o custo e o tempo de isolamento (FERNANDES et al., 2008; MOREIRA et al., 2008). O processo de separação possibilita a detecção de organismos biológicos, incluindo células e tecidos, bem como o isolamento e demonstrando ser uma técnica crucial para o diagnóstico de doenças infecciosas (OLSVIK et al., 1994). Estudos associando a técnica de reação em cadeia por polimerase (PCR) levam a métodos que melhoram a especificidade e sensibilidade da PCR, e proporcionam economia de tempo em comparação com métodos tradicionais de diagnóstico, pois a presença de moléculas bacterianas podem afetar o desempenho (ENROTH et al., 1995).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial da IMS associada a PCR como um teste de diagnóstico capaz de detectar leptospirosas em fluidos biológicos de animais.

### 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Anticorpos monoclonais (mAbs) anti LipL32 foram purificados por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose CL-4B (GE Healthcare Company, USA) de acordo com a metodologia descrita por HARLOW & LANE (1988). Os mAbs foram adsorvidos em partículas de poliestireno cobertas por proteína A segundo os procedimentos estabelecidos pelo fabricante (Bangs Laboratories Inc, Fishers, IN, USA). Resumidamente, 100 µL de esferas com 1% de sólidos foram ressuspensores em tampão de borato (50 mM, pH 8,2). Em seguida 1,2 mg de MAb LipL32 foi incubado com as partículas por 6 horas a 4°C duas vezes com tampão de borato utilizando o separador magnético Invitrogen Corporation, CA, USA) e ressuspendidas em tampão estocagem (10 mM Borato pH 8, 5, 0.1% BSA, 0.1% EDTA e 0.1% NaN<sub>3</sub>) até a separação magnética foi realizada 10 µL de partículas

adsorvidas com MAb anti LipL32 e 1 mL das diluições de *L. interrogans* sorovar Canicola. Cada variável em entre  $10^8$  a  $10^0$  leptospiras/mL.

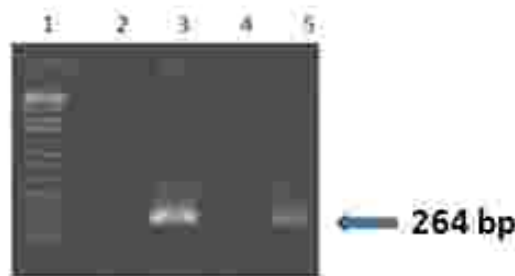
Para avaliar a capacidade de captura de leptospiras, foram utilizadas as técnicas de PCR e imunofluorescência indireta (IFDI), após incubação por 15 min a temperatura ambiente, a suspensão foi centrifugada 5 vezes com o tampão de lavagem, utilizando o imunoseparador e ressuspendidas em 20 µL de tampão para extração de DNA e incubadas a 95°C por 15 min. O DNA do produto imunoseparado foi extraído por aquecimento a 100°C durante 10 minutos em 20 µL de solução contendo 0,125% e 0,05 M de NaOH. Para a IMS-IFDI, após incubação por 15 min a temperatura ambiente com o tampão de lavagem, o imunoseparado foi depositado em lâmina, para secar a temperatura ambiente, fixado com metanol gelado por 10 min, bloqueado com soro fetal bovino (SFB) 10%, lavado e mantido em solução até o uso.

A reação de PCR foi conduzida utilizando um par de primers que amplificam a região de 264 bp do gene codificadora de *L. interrogans* em condições já estabelecidas (NASSI et al., 2003). A amplificação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo gel red. Para o ensaio de IFDI, lâminas cobertas com o imunoseparador com 10 µL de anticorpo policlonal anti *L. interrogans* sorovar Canicola conjugado a FITC (FERNANDES et al., 2004) em condições já estabelecidas à leitura e medida de fluorescência BX51 Olympus.

Cultivos puros de leptospiras foram utilizados para avaliar a eficiência da IMS, através de IFDI e PCR. Após a confirmação do sucesso de captura, as leptospiras foram analisadas por PCR para confirmar o diagnóstico metodológico de sorologia e amostras de sangue. A IMS-PCR foi utilizada para detectar leptospiras em amostras de sangue de Hamsters (n=2) infectados experimentalmente por leptospiras. As amostras dos animais foram gentilmente cedidas durante coletas em experimento de desafio de vacinas sob responsabilidade do Prof. Odir Dellagostin.

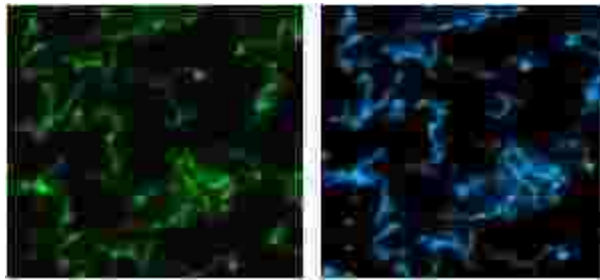
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As partículas adsorvidas com o MAb anti LipL32 foram previamente testadas com cultivos puros de leptospira a partir da concentração aproximada de  $10^8$  leptospiras por mL e a IMS foi capaz de capturar bactérias sendo possível a amplificação (Fig. 1) e a detecção por IFDI (Fig. 2) a IMS realizada somente com as partículas adsorvidas com o MAb, não foi possível capturar bactérias livres.



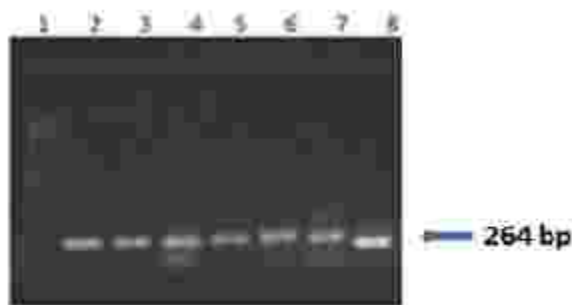
**Figura 1.** Avaliação da eficiência de captura das partículas adsorvidas com mAb anti LipL32 por PCR em cultivo contendo  $10^8$  leptospiras por mL. Eletroforese em gel de agarose com produtos da reação de PCR. 1- Marcador de DNA 1kb Plus, 2- Controle negativo, 3- Controle positivo, 4- Partículas adsorvidas com mAb anti LipL32 e cultivo de *L. interrogans* sorovar Canicola, 5- Partículas adsorvidas com mAb anti LipL32 e cultivo de *L. interrogans* sorovar Canicola.

positivo (DNA de *Leptospira*); 4- Partícula adsorvida; 5- Partícula adsorvida de MAb antiLipL32.

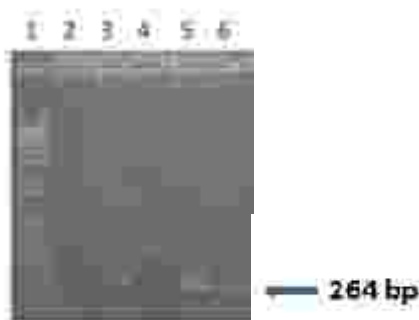


**Figura 2.** Avaliação da eficiência da separação magnética (IMS) com partículas adsorvidas com mAb anti LipL32 por imunofluorescência (IF) do cultivo contendo  $10^8$  leptospiras por mL. 1- Anticorpo policlonal anti *L. interrogans* sorovar Canicola conjugado a FITC. 2- Controle negativo- Marcador de DNA Hoechst.

O limite de detecção obtido no experimento com a técnica foi de  $10^2$  leptospiras por mL (Fig. 3) e a partir de concentrações menores não houve detecção. Quando a IMS-PCR foi realizada em amostras de soro urina artificialmente contaminadas com o mesmo í (dados não mostrados). Quando a PCR foi utilizada para detectar leptospiras em amostras de sangue de animais infectados experimentalmente e amplificar o DNA alvo nas duas amostras testadas (Fig. 4)



**Figura 3.** Limite de detecção da imunoseparação magnética (IMS-PCR) em cultivos puros de *L. interrogans*. Eletroforese em gel de agarose da IMS-PCR dos cultivos contendo diferentes concentrações de  $10^8$  a  $10^2$  leptospiras por mL. 1- Marcador de DNA 1kb Plus; 2 a 8 - IMS-PCR realizado nas concentrações de  $10^8$  a  $10^2$  leptospiras por mL.



**Figura 4.** Imunoseparação magnética associada (IMS-PCR) em amostras de animais experimentalmente infectados. Eletroforese em gel de agarose com produtos da IMS-PCR em amostras de soro de hamster. 1- Marcador de DNA 1kb Plus; 2- Controle negativo, 3- Controle positivo (DNA de *Leptospira*), 4- IMS com mAb anti LipL32, 5 e 6- IMS-PCR em sangue de animais infectados com *Leptospira*.

Os experimentos realizados neste estudo demonstraram a possibilidade de utilização da técnica de IMS associada a PCR para a detecção de leptospiras patogênicas. A IMS capturou leptospiras em cultivos puros e em amostras de sangue artificialmente contaminadas com limite de detecção de 2 bactérias por mL, e foi capaz de detectar leptospiras em sangue de animais infectados. Os resultados desta metodologia são promissores para o diagnóstico de leptospirose.

#### 4 CONCLUSÕES

A metodologia de IMS-PCR pode ser utilizada para a detecção de leptospiras patogênicas em sangue de animais infectados. Experimentos utilizando a IMS-PCR em amostras de animais suspeitos de leptospirose demonstraram a sensibilidade da técnica em amostras clínicas.

#### 5 REFERÊNCIAS

ENROTH, H. AND L. ENGSTRAND. Immunomagnetic separation and PCR for detection of *helicobacter pylori* in water and stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 2162-2165, 1995.

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

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

FERNANDES, C.P.H.; COUTINHO, M.L.; SANTOS, P.C. ; GOULARTE, K.L.; VASCONCELLOS, F.A ; MOREIRA, Â. N. ; GOULARTE, K.L.; LUDKE, C.B.; KRAHL, M., BROD, C.S.; ALEIXO, J.A.G. Produção de conjugado para diagnóstico de leptospirose por via direta. In: **XIII Congresso de Iniciação Científica VI Encontro**. Pelotas: UFPel, 2004.

MONAHAN, A. M., CALLANAN, J. J., AND NALLY, J. E. Host-Pathogen Interactions in the Kidney during Chronic Leptospirosis. **Veterinary Pathology**, v. 46, p.792-799, 2009.

MOREIRA, Â. N., CONCEIÇÃO F. R., CONCEIÇÃO R. CARVALHAL, J. B. DELLAGOSTIN, O. A., ALEIXO, J. A. G.. Detection of *Salmonella typhimurium* in raw meats using inhouse prepared monoclonal antibody coated-magnetic beads and PCR assay of the fimA gene. **Journal of Immunoassay & Immunochemistry**, v. 29, p.58-69, 2008.

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.; HOMES, E.; UGELSTAD, J.; UHLEN, M. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, p. 43-54, 1994.