

## MICROBIOLOGIA BÁSICA DE *Leptospira* spp.: RESULTADOS PRELIMINARES DO PERFIL DE CRESCIMENTO *IN VITRO* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES

**LIANA NUNES BARBOSA<sup>1</sup>; ANDRÉ ALEX GRASSMANN<sup>2</sup>; MARCELLE MOURA SILVEIRA<sup>3</sup>; JÉSSICA DIAS SOUZA<sup>4</sup>; ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – liana.tlo@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – grassmann.aa@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – marcellemsilveira@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – jessi.dias@yahoo.com.br

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – alan.mcbride@ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Leptospira* pertence à ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae e atualmente compreende 22 espécies, que podem ser parasitas ou de vida livre, sendo 10 espécies patogênicas (*L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilli*, *L. alexanderi*, *L. kmetyi*, *L. alstonii* e *L. mayottensis*), 5 espécies intermediárias (*L. inadai*, *L. broomii*, *L. faine*, *L. wolfii* e *L. licerasiae*) e 7 espécies saprófitas (*L. biflexa*, *L. wolbachii*, *L. meyeri*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae*, *L. idonii* e *L. yanagawae*) (BOURHY et al, 2014). Representantes deste gênero são o agente etiológico da leptospirose, uma zoonose emergente e negligenciada com alta incidência mundial, sendo estimado a ocorrência anual de mais de 873 mil casos graves em humanos, com aproximadamente 49 mil mortes (PICARDEAU et al, 2014).

As leptospiras foram cultivadas *in vitro* pela primeira vez por Inada et al (1916), utilizando um meio de cultura contendo rim de cobaios (*Cavia porcellus*) em líquido ascítico, selado com parafina. Atualmente, o meio mais amplamente utilizado é o EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris), baseado em ácido oleico, albumina de soro bovino e polissorbato (Tween), suplementado com sais e diversas vitaminas (ELLINGHAUSEN & MCCULLOUGH, 1965; JOHNSON & HARRIS, 1967). Porém, o cultivo *in vitro* de leptospiras é difícil de ser realizado, sensível e fastidioso, necessitando de até 16 semanas de incubação, mesmo utilizando meios de cultura enriquecidos e frequentemente ocorre contaminação por outras bactérias (BHARTI et al, 2003), dificultando a pesquisa neste campo.

Apesar de um século passado desde os primeiros estudos com leptospiras isoladas e mantidas *in vitro*, ainda não há um trabalho comparando os diferentes tipos de meios de cultivo disponíveis e condições para manutenção destes e, principalmente, as consequências disso sobre a virulência nas diferentes espécies de leptospiras patogênicas. A virulência das espécies patogênicas é um fator importante para estudos de candidatos vacinais contra a leptospirose, justamente por ser essencial para a realização dos desafios no modelo animal para a leptospirose letal (hamster), o que torna imprescindível a elucidação dos fatores que podem alterar a virulência das espécies.

O objetivo deste trabalho é determinar o perfil de crescimento *in vitro* das espécies patogênicas *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. noguchii* e da espécie saprófita *L. biflexa* nos meios de cultura EMJH caseiro e EMJH comercial sob condições diversas, incluindo diferenças de temperaturas durante o cultivo e, relacionar se a metodologia para manutenção *in vitro* afeta a virulência das cepas. Aqui apresentamos dados parciais, mostrando as curvas de crescimento de *L. interrogans* no meio EMJH comercial a 30 °C e 37 °C.

## 2. METODOLOGIA

O meio de cultura EMJH comercial foi preparado com 2,3 g de meio EMJH base (Difco) diluídos em 1 L de água ultrapura e, após a esterilização, foi adicionado 10% de suplemento comercial (Difco). O meio EMJH caseiro foi preparado conforme descrito anteriormente (ZUERNER 2005), e suplementado com 1% de soro de coelho estéril e 10% de suplemento preparado conforme descrito anteriormente (ZUERNER 2005).

Uma alíquota de 1 ml do estoque da espécie *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 foi descongelada em temperatura ambiente e adicionada em 5 ml de meio EMJH comercial por um dia a 30 °C. Em seguida, foi realizada a passagem desta cultura para o meio EMJH comercial com inóculos iniciais de  $10^5$  ou  $10^6$  bactérias/ml a 30 °C e a 37 °C. O inóculo foi realizado no dia 0 e a primeira contagem realizada no dia 04, dando inicio à curva de crescimento. A partir daí a determinação da densidade celular por contagem foi realizada diariamente, até a fase de declínio de crescimento. As contagens foram realizadas através de diluição seriada, 1:10, 1:100 e 1:1000, conforme a densidade celular, de forma a contar entre 10 e 100 leptospiras na área delimitada pela câmara de Petroff-Hausser, sob microscopia de campo escuro. O cálculo de densidade bacteriana na cultura foi realizado considerando: n° de leptospiras no quadrante delimitado pela câmara × fator de diluição × 5 ×  $10^4$  = n° de leptospiras/ml de cultura. O crescimento bacteriano foi acompanhado por contagens diárias. Para cada condição, 3 culturas diferentes foram mantidas em crescimento e, cada uma teve a densidade celular analisada em triplicada diariamente.

Diferentes densidades iniciais de cultivo foram testadas em EMJH caseiro e comercial, a citar  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$ , em 5 ml totais de cultura, incubados a 30 °C e 37 °C. Estas culturas foram avaliadas diariamente buscando a presença de leptospiras até 10 semanas após o inicio do cultivo.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No quarto dia após início da curva de crescimento com inoculo inicial de  $10^5$  leptospiras/ml, a densidade celular era de aproximadamente  $10^6$  bactérias/ml, ou seja, inicio da fase exponencial de crescimento (Figura 1A). A densidade bacteriana seguiu aumentando até o nono dia, já com  $10^9$  bactérias/ml, dando inicio a fase estacionária, onde permaneceu até o dia 17. No dia 18, iniciou a fase de declínio, caindo para uma concentração de aproximadamente  $10^8$  bactérias/ml mantida até o dia 26 da curva de crescimento. Com este inóculo inicial, os cultivos à 37°C não apresentaram crescimento, mesmo após sete dias de observação (Figura 1A).

Uma segunda curva foi realizada para a mesma cepa de *L. interrogans* partindo de um inóculo inicial de  $10^6$  bactérias/ml (Figura 1B). No quarto dia após o inicio deste cultivo as culturas a 30 °C já apresentavam densidade bacteriana de  $10^8$  bactérias/ml, permanecendo na fase exponencial até o dia 09, onde atingiram aproximadamente  $9 \times 10^9$  leptospiras/ml. A partir do décimo dia do crescimento bacteriano as culturas entraram em fase de declínio, com variações na densidade celular, permanecendo até o dia 19 da curva com concentrações de  $10^8$  bactérias/ml. As culturas submetidas à temperatura de 37°C alcançaram densidade bacteriana menor, quando comparadas aos cultivos de 30 °C, somente

alcançando densidade semelhante aos cultivos a 30°C no dia 14 desta curva de crescimento.

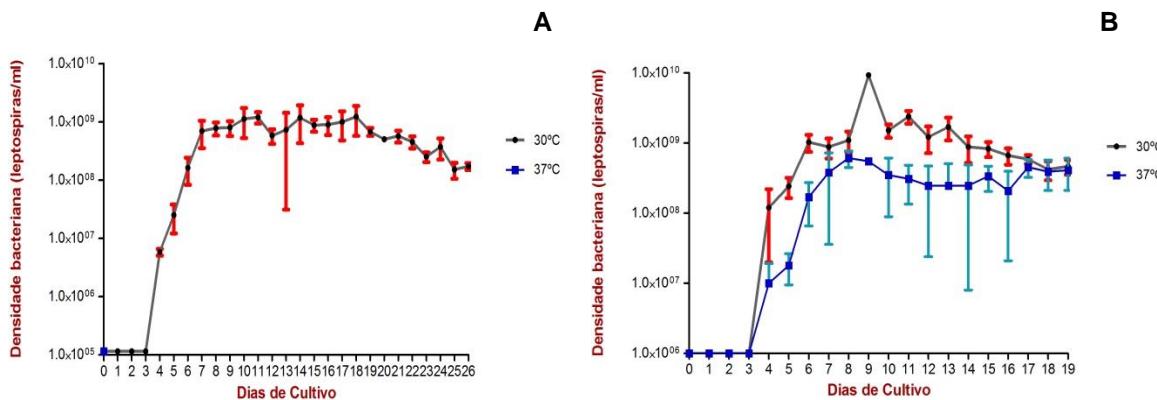


Figura 1 – Gráficos representando a curva de crescimento bacteriano para a espécie *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 em meio de cultura EMJH comercial sob temperaturas de 30 °C e 37 °C. A) Inóculo inicial de  $10^5$  leptospiras/ml; B) Inóculo inicial de  $10^6$  leptospiras/ml. As linhas representam a média das três contagens e as barras o desvio padrão

Os resultados dos testes de densidades celulares iniciais demonstraram que após quatro semanas de acompanhamento dos cultivos iniciados com diferentes densidades bacterianas no meio de cultura EMJH comercial, somente o inóculo de  $10^4$  leptospiras/ml a 30 °C apresentou crescimento. Nenhuma leptospira foi observada a 37 °C neste meio, mesmo quatro semanas após início do cultivo. Diferente disso, o meio de cultura EMJH caseiro proporcionou crescimento de inóculos de  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$  em ambas temperaturas de incubação. Esses resultados sugerem que a complexidade dos meios de culturas reflete no crescimento celular de leptospires. Os resultados gerados nas curvas de crescimento mostram que a temperatura parece ser um fator importante durante o crescimento de *L. interrogans*. O cultivo *in vitro* de leptospires é rotineiramente mantido a 30 °C (FAINE et al, 1999) porém, a 37 °C as leptospires expressam genes que codificam fatores de virulência, não expressos a 30 °C e que possivelmente influenciem no estabelecimento da doença e invasão do hospedeiro (LO et al, 2006; CAIMANO et al, 2014). Nós acreditamos que leptospires cultivadas a 37 °C sejam mais virulentas do que aquelas mantidas a 30 °C, e o meio de cultura caseiro parece ser necessário para um crescimento *in vitro* rápido desta espécie patogênica a 37 °C.

#### 4. CONCLUSÕES

Os dados parciais apresentados aqui sugerem que existem diferenças no perfil de crescimento de *L. interrogans* nos meios EMJH caseiro e comercial. Em meio comercial, o crescimento mostrou-se diferente entre as temperaturas de 30 °C e 37 °C quando o inóculo de  $10^5$  leptospiras/ml foi utilizado. Além disso, inóculos iniciais baixos de *L. interrogans* só resultam em cultura viável quando utilizando EMJH caseiro, especialmente a 37 °C.

A perspectiva para o seguimento deste trabalho envolve a obtenção de dados para outras espécies, visando elucidar qual o tipo de meio de cultura ideal para o cultivo *in vitro* de *Leptospira* spp. e as condições a ele associadas e

determinar relação entre o tipo de cultivo e as variações de virulências das cepas patogênicas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAR, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v.3, n.12, p.757-771, 2003.
- BOURHY, P.; COLLET, L.; BRISSE, S.; PICARDEAU, M. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic *Leptospira* species isolated from humans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, e. 12, p.4061-4067, London, 2014.
- CAIMANO, M. J.; SIVASANKARAN, S. K.; ALLARD, A.; HURLEY, D.; HOKAMP, K.; GRASSMANN, A. A.; HINTON, J. C. D.; NALLY, J. E. A model system for studying the transcriptomic and physiological changes associated with mammalian host-adaptation by *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **PLOS Pathogens**, v.10, ed.3, e1004004. doi:10.1371/journal.ppat.1004004, San Francisco, 2014.
- ELLINGHAUSEN, H. C.; MCCULLOUGH, W. G. Nutrition of "*Leptospira pomona*" and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. **American Journal of Veterinary Research**, v.26, p.45-51, Schaumburg, 1965.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. ***Leptospira* and leptospirosis**. 2 ed. Melbourne: MediSci, 1999. 272p.
- INADA, R.; IDO, Y.; HOKI, R.; KANEKO, R.; ITO, H. The etiology, mode of infection, and specific therapy of weil's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica). **Journal of experimental medicine**, v.23, p. 377-402, New York, 1916.
- JOHNSON, R. C.; HARRIS, V.G. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I. Growth at low temperatures. **Journal of Bacteriology**, v.94, p.27-31, Washington, 1967.
- LO, M; BULACH, D. M.; POWELL, D. R.; HAAKE, D.A.; MATSUNAGA, J.; PAUSTIAN, M. L.; ZUERNER, R. L.; ADLER, B. Effects of temperature on gene expression patterns in *Leptospira interrogans* serovar Lai as assessed by whole-genome microarrays. **Infection and Immunity**, v.74, n. 10, p.5848–5859, Washington , 2006.
- PICARDEAU, M.; BERTHERAT, E.; JANCLÖES, M.; SKOLOUDIS, A. N.; DURSKI, K.; HARTSKERL, R. A. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.78, n.1, p. 1-8, 2014.
- ZUERNER, R. L. Laboratory maintenance of pathogenic *Leptospira*. **Current Protocols in Microbiology**, 2E.1.1-12E.1.13, 2005.