

INFLUÊNCIA DA FASE DE CRESCIMENTO BACTERIANO *IN VITRO* NA VIRULÊNCIA DE *Leptospira interrogans* SOROGRUPO ICTEROHAEMORRHAGIAE CEPA RCA

VÍTOR DA SILVEIRA ALBA¹; LIANA NUNES BARBOSA²;
ANDRÉ ALEX GRASSMANN³; ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE⁴

¹LPDI, Núcleo de Biotecnologia, CD Tec, UFPel – vitor.s.alba@gmail.com

²LPDI, Núcleo de Biotecnologia, CD Tec, UFPel – liana.tlo@gmail.com

³LPDI, Núcleo de Biotecnologia, CD Tec, UFPel – grassmann.aa@gmail.com

⁴LPDI, Núcleo de Biotecnologia, CD Tec, UFPel – alan.mcbride@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infecciosa, negligenciada, de distribuição mundial e é causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* (FOUTS et al., 2016). Estima-se que mais de 1 milhão de novos casos ocorram anualmente em humanos, resultando na morte de 58,9 mil pessoas (COSTA et al., 2015). A zoonose também afeta outros animais, como bovinos e suínos (ELLIS, 2015). Assim, não somente influencia a vida humana diretamente, como indiretamente, se tratando sobre a redução da produtividade pecuária (SANHUEZA et al., 2013).

Deste modo, torna-se indispensável o desenvolvimento de métodos profiláticos competentes como, por exemplo, as vacinas. Para a validação da eficácia vacinal é necessária a experimentação animal, onde dois princípios básicos são essenciais. O primeiro é a imunização dos animais com o preparo vacinal contendo o antígeno de interesse e, o segundo, a infecção dos animais com leptospires virulentas vivas, assim “desafiando” a vacina para comprovar sua efetividade.

Entretanto, estudos utilizando microensaios *in vitro* com leptospires submetidas a diferentes condições durante o cultivo, como alterações de temperatura, podem influenciar na expressão de genes relacionados a fatores de virulência e patogenicidade das bactérias (CAIMANO et al., 2014; LO et al., 2009; QIN et al., 2006). Consequentemente, influenciando os resultados de experimentos com desenvolvimento de vacinas. Em vista disto, este trabalho tem como objetivo avaliar se diferenças durante o cultivo *in vitro* de *Leptospira interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae cepa RCA afetam a virulência dessa espécie através da determinação da dose de virulência (DV50%) em hamsters Syrian (*Mesocricetus auratus*) que são o modelo animal suscetível para infecção aguda.

2. METODOLOGIA

A espécie patogênica *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae cepa RCA foi cultivada em meio de cultura EMJH++ (ZUERNER 2005) sob temperaturas de 28 °C (Experimentos 1.1 e 1.2) que é a temperatura descrita na literatura como ideal para o crescimento (CAMERON, 2015) e de 37 °C (Experimento 2), que simula a temperatura do hospedeiro mamífero. O experimento 1 foi realizado em duplicata e a segunda repetição do experimento 2 está em andamento.

Para determinar se existem diferenças na virulência das bactérias nas fases da curva de crescimento bacteriano, leptospires oriundas de quatro pontos da curva de crescimento bacteriano foram utilizadas. Para definir quais seriam os pontos de escolha para as fases exponencial e estacionária, uma curva de

crescimento padrão realizada em estudos prévios (dados não publicados) foi utilizada como modelo (Figura 1).

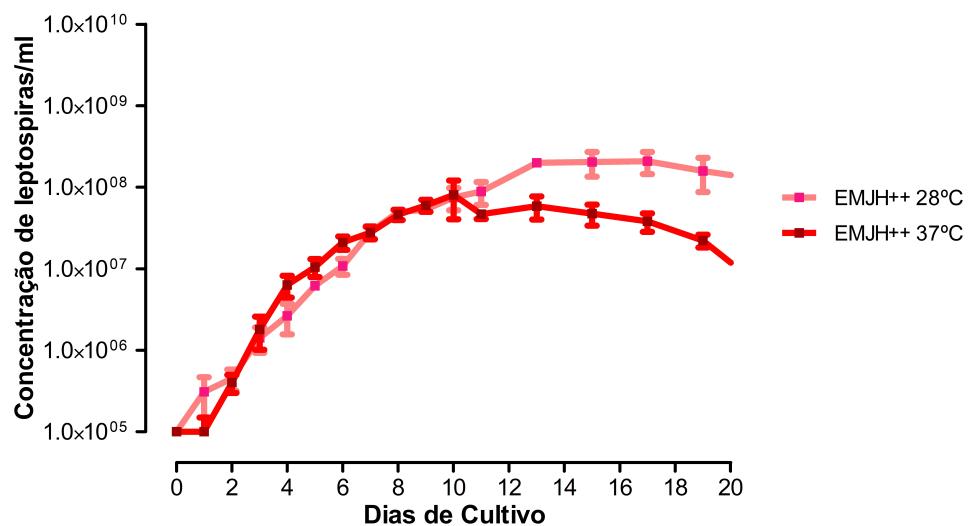


Figura 1 – Curva de crescimento bacteriano de *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae cepa RCA cultivada em 5ml de EMJH++ a 28 °C (rosa) e 37 °C (vermelho). Inóculo inicial de 10⁵ leptospiras/ml. As linhas representam a média das 3 culturas contadas e as barras o desvio padrão

As fases de crescimento selecionadas foram i) fase inicial do crescimento exponencial (E.I.); ii) fase mediana do crescimento exponencial (E.M.); iii) fase final do crescimento exponencial (E.F.) e iv) fase estacionária (Est.). Os dias selecionados e as concentrações de leptospiras/ml de cada experimento e condição estão representados na Tabela 1.

Fase	Exp 1.1 (28 °C)				Exp 1.2 (28 °C)				Exp 2 (37 °C)			
	E.I.	E.M.	E.F.	Est.	E.I.	E.M.	E.F.	Est.	E.I.	E.M.	E.F.	Est.
Dias	2	5	11	16	2	4	11	17	2	5	10	12
Lp/ml*	6.10 ⁵	1.10 ⁷	3.10 ⁸	3.10 ⁸	5.10 ⁵	1.10 ⁷	4.10 ⁸	3.10 ⁸	7.10 ⁵	1.10 ⁷	4.10 ⁷	3.10 ⁷

* Lp/ml = leptospiras/ml

Tabela 1 – Delineamento experimental escolhido para as diferentes fases da curva de crescimento bacteriano de *Leptospira interrogans* cepa RCA

Cada um dos cultivos em sua determinada fase de crescimento e condição foram feitos e para determinar as doses de virulência para 50% dos animais (DV50%) foi executada a inoculação em hamsters Syrian. Este modelo biológico foi selecionado pelo fato de ser de linhagem heterogênea, de pequeno porte e capazes de reproduzir um quadro clínico de leptospirose aguda (GOMES-SOLECKI et al., 2017). Os hamsters foram divididos em grupos de 3 animais com 10 a 12 semanas de idade. Cada grupo foi infectado com 1ml de leptospiras vivas pela via intraperitoneal com as concentrações de 10⁰, 10¹, 10² e 10³ leptospiras/ml.

O fluxograma apresentado na figura 2 demonstra a metodologia utilizada para realizar o experimento *in vivo*. Após a infecção, os animais foram monitorados diariamente buscando a presença de sinais clínicos da doença durante 28 dias pós-infecção, respeitando todos os princípios éticos de experimentação animal (CEEA/UFPEL, n.º 4337-2015). Um animal cuja massa corporal decaiu 10% ou ainda, animais sobreviventes ao final dos experimentos foram eutanasiados por asfixia com CO₂ em câmara específica.

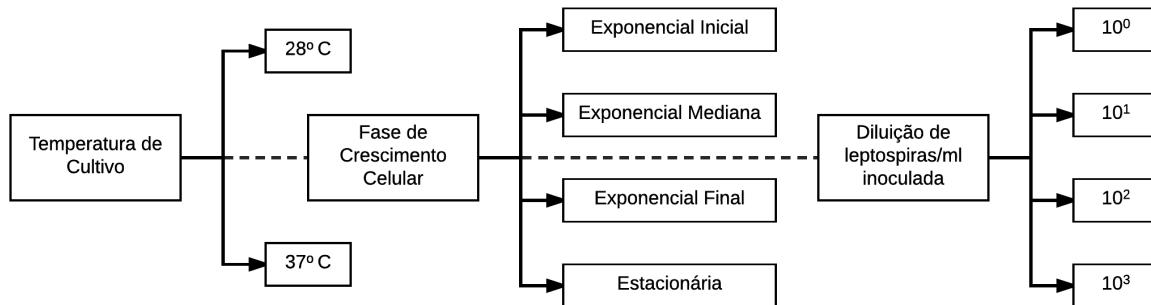


Figura 2 – Fluxograma com a representação da metodologia da divisão dos grupos de animais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pela sobrevivência dos animais infectados com leptospires virulentas geraram as doses de virulência que levam 50% dos animais ao óbito (DV50%) para cada condição. Dessa forma, foi possível comparar qual condição de cultivo manteve a DV50% mais baixa. Os valores obtidos estão representados na tabela 2.

Fase	Exp 1.1 (28 °C)				Exp 1.2 (28 °C)				Exp 2 (37 °C)			
	E.I.	E.M.	E.F.	Est.	E.I.	E.M.	E.F.	Est.	E.I.	E.M.	E.F.	Est.
DV50%	3.16	3.16	10	>10 ³	1,78	1,78	17,8	562	<1	1,78	17,8	5,62

Tabela 2 – Doses de virulência para levar ao óbito 50% dos animais infectados com leptospires virulentas (DV50%) em hamsters Syrian.

As diferenças observadas entre as fases do crescimento no experimento 2 não foram significativas, indicando que cultivos mantidos a 37 °C podem ser mais virulentos que os mantidos nos experimentos 1.1 e 1.2, onde foi utilizada a temperatura de 28 °C. Esses resultados sugerem que a temperatura de 37 °C pode simular mais adequadamente o ambiente do hospedeiro mamífero, fazendo com que leptospires sejam mais virulentas. Diferente disso, nos experimentos 1.1 e 1.2 houve um aumento da DV50% conforme o decorrer da curva de crescimento bacteriano. Esta variação nos experimentos 1.1 e 1.2 podem indicar que um cultivo mais velho, com menos substrato e mais produtos metabólicos, pode favorecer e selecionar o crescimento de bactérias mais adaptadas a um ambiente com menor disponibilidade de recursos e de temperatura diferente a do hospedeiro (28 °C).

4. CONCLUSÕES

Não existe diferença nas DV50% dos animais infectados com cultivos que cresceram a 37 °C em diferentes fases de crescimento.

Entretanto, a 28 °C as diferenças entre as DV50% da fase exponencial inicial e mediana quando comparadas a exponencial final e estacionária são significativas. Isto demonstra que nesta temperatura a fase de crescimento bacteriano pode alterar a virulência das leptospires e, consequentemente, os resultados de experimentos de virulênciavacinologia onde se busca a virulência adequada das leptospires.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAIMANO, M. J. et al. A Model System for Studying the Transcriptomic and Physiological Changes Associated with Mammalian Host-Adaptation by *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 3, 2014.
- CAMERON, C. E. Leptospiral Structure, Physiology, and Metabolism. In: ADLER, B. (Ed.). **Leptospira and Leptospirosis**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015. p. 21–41.
- COSTA, F. et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 0–1, 2015.
- ELLIS, William A, Animal Leptospirosis, *in:* ADLER, Ben (Org.), **Leptospira and Leptospirosis**, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015, p. 99–137.
- FOUTS, D. E. et al. What Makes a Bacterial Species Pathogenic?:Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. 1–57, 2016.
- GOMES-SOLECKI, M.; SANTECCHIA, I.; WERTS, C. Animal models of leptospirosis: Of mice and hamsters. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. FEB, 2017.
- LO, M. et al. Comparative transcriptional and translational analysis of leptospiral outer membrane protein expression in response to temperature. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 12, 2009.
- QIN, J.-H. et al. Genome-wide transcriptional analysis of temperature shift in *L. interrogans* serovar Iai strain 56601. **BMC microbiology**, v. 6, p. 51, 2006.
- SANHUEZA, J. M.; HEUER, C.; WEST, D. Contribution of *Leptospira*, *Neospora caninum* and bovine viral diarrhea virus to fetal loss of beef cattle in New Zealand. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 112, n. 1–2, p. 90–98, 2013.
- ZUERNER, R. L. Laboratory maintenance of pathogenic *Leptospira*. **Current Protocols in Microbiology**, 2E.1.1-12E.1.13, 2005.